Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
(Direktor: Prof.Dr.Dr.E.H. Graul)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
(Direktoren: Prof.Dr.Dr.E.H.Graul und Prof.Dr.F.Heß)

# QUANTITATIVE DIGOXINBESTIMMUNG IM SERUM MITTELS ENZYMIMMUNOASSAY

## Methodik, Kreuzreaktionen und Störfaktoren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GERNOT FÖRSTER
aus Ludwigshafen/Rhein

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. H. Graul)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
(Direktoren: Prof. Dr. Dr. E. H. Graul und Prof. Dr. F. Heß)

# QUANTITATIVE DIGOXINBESTIMMUNG IM SERUM MITTELS ENZYMIMMUNOASSAY

Methodik, Kreuzreaktionen und Störfaktoren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GERNOT FÖRSTER
aus Ludwigshafen/Rhein

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 28.05.1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof.Dr.F.Neurath
Referent: Prof.Dr.Dr.E.H.Graul
Korreferent: Prof.Dr.H.Kaffarnik

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0004

Inhaltsverzeichnis


| | | |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Methoden zur Bestimmung von Digitalis | 3 |
| 2.1. | Gaschromatographie | 3 |
| 2.2. | Double isotope dilution derivative method | 4 |
| 2.3. | Enzymatic isotope displacement assay | 5 |
| 2.4. | Radioimmunoassay (RIA) | 6 |
| 2.5. | Hemmung der $^{86}$Rb-Aufnahme von Erythrozyten ($^{86}$Rb-Test) | 7 |
| 2.6. | Hemmung der $Na^+$-$K^+$-aktivierbaren ATPase | 8 |
| 2.7. | Enzymimmunoassay (EIA) | 9 |
| 3. | Versuchsdurchführung mit dem EMIT-Digoxin-Assay | 12 |
| 4. | Übersicht über die untersuchten Substanzen | 17 |
| 4.1. | Cardenolide | 17 |
| 4.2. | Bufadienolide | 29 |
| 4.3. | Steroidhormone | 3o |
| 5. | Versuchsergebnisse | 34 |
| 5.1. | Kreuzreagibilität mit Cardenoliden | 34 |
| 5.2. | Kreuzreagibilität mit Bufadienoliden | 44 |
| 5.3. | Kreuzreagibilität mit Steroidhormonen | 44 |
| 5.4. | Interferenzen von pathologischen Seren | 45 |
| 6. | Diskussion | 47 |
| 7. | Zusammenfassung | 48 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 5o |
| 9. | Anhang (Abbildungen und Tabellen) | 6o |
| 1o. | Nachtrag | 67 |
| 1o.1. | FRAT$^R$ Spin-Immunoassay | 67 |
| 1o.2. | Cofaktor- markierte Haptene | 68 |
| 1o.3. | Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay (ELISA) | 68 |
| 1o.4. | Nicht-kompetitive Bindungsanalyse ("Sandwich"-Technik) | 69 |
| 1o.5. | Fluoreszenz-Immunoassay | 7o |
| 1o.6. | Phagenimmunoassays | 7o |
| 1o.7. | Biologische Membranelektroden | 7o |
| 11. | Literaturverzeichnis zum Nachtrag | 72 |

## 1. Einleitung

Seit Jahrzehnten sind Digitalisglykoside ein fester Bestandteil der wirkungsvollen Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. Ihre Dosierung richtet sich wie bei allen Medikamenten primär nach empirischen Richtwerten und nach dem Behandlungserfolg, also nach klinischen Parametern. Allerdings sind Überdosierungen bei der nachteilig geringen therapeutischen Breite, den interindividuellen Unterschieden in der Pharmakokinetik und Glykosidtoleranz fast unvermeidlich, wenn in bestimmten Situationen die volle Wirksamkeit ausgeschöpft werden muß (37). Für den Einzelfall kann trotz Nomogramm die Abschätzung der Erhaltungsdosis z. B. für Digoxin schwierig werden bei Niereninsuffizienz (12,44), bei Störungen des Elektrolythaushaltes (23, 1o2), bei Resorptionsstörungen wie dem Malabsorptionssyndrom (39,48) und bei Medikamenteninterferenzen wie mit Neomycin (66). Ältere Patienten tendieren zu Digitalisretentionen wegen des im Alter erniedrigten Glomerulumfiltrates (4,24,33). Bei bereits mit Digitalis anbehandelten Patienten mit Rhythmusstörungen ist bei einer Erstkonsultation die Frage oft schwierig zu beantworten, ob die Störungen Folge eines erhöhten Digitalisspiegels oder primär myokardial bedingt sind; das EKG kann gerade unter Digitalis vieldeutig sein und die Differenzierung nicht erleichtern (88).

Wenn auch - besonders nach amerikanischen Untersuchungen - die Digitalisintoxikationsquote bis zu 22% betragen kann (4,83,97), so ist das Pendant, eine Digitalisunterdosierung mit entsprechend unausgeschöpfter Therapiechance, noch eine Dunkelziffer. Die häufigsten Ursachen für diese Unterdosierung dürften die Vergeßlichkeit alter Patienten bezüglich einer regelmäßigen Tabletteneinnahme und die Furcht des behandelnden Arztes vor einer unkontrollierten Überdosierung sein.

In den letzten Jahren konnten Methoden zur Konzentrationsbestimmung vor allem von Digoxin und Digitoxin im Serum entwickelt werden. Zu den klinischen Parametern ist somit besonders für kritische Situationen und für die Überwachung von Problemfällen ein Laborparameter hinzugekommen, der - eine hohe Verläßlichkeitsgarantie vorausgesetzt - dem behandelnden Arzt mehr Sicherheit bei

der Digitalisierung geben könnte. Eine bessere Anpassung der Dosis an den Einzelfall dürfte dadurch möglich sein; bei longitudinalen Kontrollen könnten Tendenzen der Über- oder Unterdosierung frühzeitig erkannt und die Dosis entsprechend korrigiert werden. Nach ersten Mitteilungen konnte unter konsequenter Berücksichtigung der Serumkonzentration für die Digitalisverordnung die Häufigkeit der Intoxikationen von 13,9% auf 5,9%, also um gut die Hälfte, gesenkt werden (55). Wegen der Überlappung von therapeutischen und toxischen Serumkonzentrationen (2o,3o) und der individuell unterschiedlichen Digitalistoleranz (11) hat allerdings eine Einzelbestimmung nur eine beschränkte Aussagekraft; erst der Vergleich mit früheren Werten erlaubt in Synopsis mit der klinischen Symptomatik eine Beurteilung der aktuellen Situation (3o).

In der vorliegenden Schrift wird zur Methode eines neuentwickelten Verfahrens zur Digoxinbestimmung im Patientenserum, dem Enzymimmunoassay (EIA), und besonders zu seiner Spezifität und zu Fehlermöglichkeiten Stellung genommen.

## 2. Methoden zur Bestimmung von Digitalis

Seit Mitte des vergangenen Jahrzehnts haben Fortschritte der Biochemie die Entwicklung verschiedener Methoden ermöglicht, die eine quantitative Bestimmung der geringen Herzglykosidkonzentration im Plasma erlauben mit einer zum Teil bemerkenswerten Präzision, Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Für Digoxin z.B. liegt die durchschnittliche therapeutische Serumkonzentration im Pseudoäquilibrium bei o,5 - 2 ng/ml (4,8,1o,19,2o,32,34,51, 65,8o,95). Toxische Konzentrationen sind wegen der geringen therapeutischen Breite der Herzglykoside nur um den Faktor 1,5 - 3 größer (3o). Die mit den nachstehend aufgeführten subtilen biochemischen Methoden meßbaren Serumkonzentrationen sind jedoch nicht in jedem Fall repräsentativ für die in vivo nicht meßbare rezeptorgebundene, pharmakodynamisch wirksame Glykosidkonzentration des Myokards.

Experimentelle und zum Teil bereits Routineanwendung für die quantitative Digitalisbestimmung im Serum, Urin und in Geweberextrakten haben insbesondere sieben Verfahren erlangt.

Sie lassen sich in direkte und indirekte Bestimmungsmethoden unterteilen (13,19,3o):

I. Direkte Bestimmungsverfahren:
   1. Gaschromatographie
   2. Double isotope dilution derivative method
   3. Enzymatic isotope displacement assay
   4. Radioimmunoassay (RIA)

II. Indirekte Bestimmungsverfahren:
   1. Hemmung der $^{86}Rb$-Aufnahme von Erythrozyten ($^{86}Rb$-Test)
   2. Hemmung der $Na^+$-$K^+$-aktivierbaren ATPase
   3. Enzymimmunoassay (EIA)

Bis auf II/2 und II/3 sind alle Methoden radioisotopentechnische Verfahren. Außer I/4 und II/3 erfordern alle Verfahren eine Serumextraktion.

### 2.1. Gaschromatographie

Ein erstmals 1963 von JELLIFFE und BLANKENHORN (53) beschriebenes gaschromatographisches Verfahren zur Trennung von Digitoxin und Digitoxigenin im Urin wurde von 1969 bis 1972 durch

TAN (1oo), WATSON, KALMAN, TRAMELL und CLARK (1o5,1o6,1o7) weiterentwickelt und zur Digoxinbestimmung im Serum angewendet. Das in 1o ml Plasma befindliche Glykosid wird in zahlreichen Reinigungsschritten wie Extraktion, Säulen- und Dünnschichtchromatographie separiert und gereinigt, zum Genin hydrolysiert und mit Heptafluorbuttersäureanhydrid derivatisiert, wobei durch Absättigung der OH-Gruppen stabile und sublimierbare Fluor-Steroidverbindungen entstehen. Dieses Reaktionsprodukt wird nach dünnschichtchromatographischer Abtrennung der Begleitsubstanzen gaschromatographisch mittels Elektroneneinfangdetektor bestimmt. Zur Verlustberechnung während der Aufarbeitung wird der Plasmaprobe anfangs eine bestimmte Menge $^{3}$H-Digoxin zugesetzt, deren Ausgangs- und Endkonzentration im Liquid-Szintillationszähler gemessen wird.
Wegen des arbeitsintensiven, zeitlichen und apparativen Aufwandes hat diese Methode keinen Eingang in das klinische Routinelabor gefunden, obgleich sie eine relativ hohe Nachweisempfindlichkeit von o,2 ng/ml Plasma hat.

2.2. Double isotope dilution derivative method

LUKAS und PETERSON (7o,71) beschrieben 1964 diese Methode zur Bestimmung von Digitoxin im Plasma, deren Prinzip in der in vitro radioaktiven Markierung der nachzuweisenden Substanz besteht. Der Methylenchloridextrakt von 1o ml Plasma wird papierchromatographisch von Begleitsubstanzen gereinigt und mit $^{14}$C-Essigsäureanhydrid in einem Benzol-Pyridin-Gemisch für 4 Tage inkubiert, wobei $^{14}$C-Digitoxinacetat entsteht. Die $^{14}$C-Radioaktivität des Reaktionsproduktes wird nach nochmaliger papierchromatographischer Reinigung mit verschiedenen Laufmitteln zusammen mit dem zu Beginn der Analyse zugesetzten $^{3}$H-Digitoxin zur Korrektur des Digitalisverlustes während der Arbeitsprozedur in einem Liquid-Szintillationsspektrometer gemessen und auf diese Weise der Digitoxingehalt der Plasmaprobe ermittelt. Die Nachweisempfindlichkeit von anfangs 1 ng/ml konnte inzwischen verbessert werden, sodaß jetzt auch Digoxin, Digoxigenin und Digitoxigenin im Serum, in Exkrementen und aus Geweben quantitativ bestimmt werden können (72). Somit können mit dieser Methode Digitoxinmeta-

bolite differenziert und die Methode für Stoffwechselstudien eingesetzt werden, ohne die Probanden mit radioaktiv markierten Glykosiden zu belasten. Das Verfahren konnte wegen des beachtlichen Zeitaufwandes nicht über die Forschung hinaus in der klinischen Routine eingeführt werden.

2.3. Enzymatic isotope displacement assay

Dieser Test wurde von BROOKER und JELLIFFE 1969 beschrieben (15, 16). Er beruht auf der konkurrierenden Bindung von Herzglykosiden an der Membran-ATPase von Säugetieren. Der eingedampfte Chloroformextrakt von 5 ml Serum wird in Toluol-Tris-Puffer aufgenommen. Nach Verdampfen des Toluols wird mit einer kleinen Menge ATPase aus Meerschweinchenhirn und einer bestimmten Menge $^{3}$H-Ouabain als Indikator 1/2 bis 1 Stunde inkubiert. Nach Zentrifugation wird die $^{3}$H-Radioaktivität des Überstandes im Liquid-Szintillationszähler gemessen und aus dem Defizit zur $^{3}$H-Ouabain-Vorgabe der Glykosidgehalt des Serums berechnet; es besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem ungebundenen $^{3}$H-Ouabaingehalt des Überstandes und der Digitaliskonzentration im Serum.
Wenn auch für diese Methode eine Serumextraktion erforderlich ist, so empfiehlt sich dieses Verfahren dennoch für die klinische Laborroutine, und zwar wegen seiner günstigen Nachweisempfindlichkeit von o,5 ng/ml Digoxin oder Digitoxin und der relativ kurzen Arbeitszeit. Ein anderer Vorteil liegt im Prinzip: nur die biologische Wirkung von Herzglykosiden und ihrer kardioaktiven Metaboliten wird über die spezifische Digitalisbindung am Rezeptor der Membran-ATPase nachgewiesen. Entsprechend ihrer pharmakologischen Wirkung am Herzen verdrängen - wie experimentell nachgewiesen werden konnte (3o) - die verschiedenen Herzsteroide quantitativ unterschiedlich das tritiierte g-Strophanthin aus seiner spezifischen Rezeptorbindung. Dieser Assay bietet sich auch bei Einnahme eines unbekannten Herzglykosids im Falle einer Intoxikation ohne eruierbare Anamnese an, das Ausmaß der Rezeptorsättigung zu messen und somit auf die Quantität der Intoxikation zu schließen (3o).

## 2.4. Radioimmunoassay (RIA)

Dieser Test vereinigt in sich sowohl das Prinzip der Antigen-Antikörper-Komplexbildung als auch das der Radioisotopenverdünnung. Der RIA zur Digitalisbestimmung ist entsprechend dem RIA für die Insulinbestimmung nach YALOW und BERSON (111) entwickelt worden. Die ersten Anwender des Digitoxin- und Digoxin-RIA waren 1968 OLIVER et al. (79) und 1969 SMITH et al. (95). Benötigt werden ein Antiserum mit ausreichend hoher Spezifität gegen das jeweilige Herzsteroid und das gleiche markierte Glykosid mit genügend hoher spezifischer Radioaktivität. Die radiochemische $^{3}H$-Markierung kann als Random-Markierung nach WILZBACH (1o8) oder als selektive nach VON WARTBURG (1o3) oder HABERLAND (45, 46) erfolgen; eine biosynthetische Markierung mit z.B. $^{14}CO_2$ ergibt zu geringe spezifische Radioaktivitäten (35,36). Für die Erzeugung von Antidigitalis-Antikörpern bei Kaninchen oder Schafen ist, da die Herzglykoside mit einem zu kleinen Molekulargewicht nur Haptene sind, eine kovalente Koppelung an Proteine unbedingt notwendig. Diese Koppelung mit Albumin wird z.B. über eine Perjodatoxidation des Glykosids und Natriumborohydrid (31) oder über eine Succinylderivatisierung der Genine (79) erreicht (25,96). Antiseren werden gegen Digitoxin, Digoxin und g-Strophanthin erzeugt. Allerdings zeigen die meisten gegen Digoxin hergestellten Antiseren gegenüber Digoxin-Metaboliten wie Bis- und Monodigitoxo-digoxigenin eine etwa gleich große Affinität wie für das Digoxin selbst (64,77,81).

o,o5 - 1 ml Patientenserum wird im Doppelansatz zusammen mit bestimmten Mengen markierten Glykosids und Antiserum für durchschittlich 3o Minuten inkubiert, danach der nichtgebundene Tracer abgetrennt und die gebundene Radioaktivität gemessen. Bei den meisten RIA zur Digitalisbestimmung wird für die Separation des ungebundenen vom gebundenen Tracer Dextran-Charcoal verwendet; aber auch Doppelantikörper- (62) und Solidphase-Methoden (58,78) sind jüngst entwickelt worden. An einer mit jeder Testdurchführung zu erstellenden Eichkurve wird die Digitaliskonzentration für die vorgegebene Serumprobe abgelesen; es besteht entsprechend der Kompetition eine umgekehrte Proportionalität zwischen der gemessenen Radioaktivität und dem Glykosidgehalt

im Patientenplasma.
Die Glykosidkonzentration im Serum wird durch Inkorporation von radioaktiv markierten Herzsteroiden etwas höher bestimmt als mit anderen Nachweisverfahren wie z.B. mit dem RIA (27,77).
Der RIA als Methode ohne Serumextraktion hat eine gute Reproduzierbarkeit und hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze z.B. von weniger als o,1 ng/ml für Digoxin; deshalb genügen bereits geringe Ausgangsmengen von Patientenserum. Mit dem RIA können auch die Glykosidkonzentrationen im Urin und in Gewebeextrakten bestimmt werden.
Wegen der relativ einfachen Durchführbarkeit, dem geringen Zeit- und apparativen Aufwand finden radioimmunologische Tests zunehmend Eingang in Laboratorien, Kliniken und auch Praxen, zumal bereits verschiedene Radioimmunoassays als gebrauchsfertige Kits für die Bestimmung von Hormonen, Plasmaproteinen, Enzymen, Vitaminen, Antigenen und Arzneistoffen kommerziell angeboten werden (76).
Gegenüber dem $^{86}$Rb-Test, der ATPase-Hemmung und dem Enzymatic isotope displacement assay wird mit dem RIA keine biologische Wirkspezifität, sondern eine immunologische Strukturspezifität erfaßt. Da die Antikörperspezifität auf das Steroidgerüst gerichtet ist, werden auch biologisch unwirksame Metabolite wie z.B. das Dihydrodigoxin mitbestimmt; da der Metabolitenanteil im Blut aber klein ist, ist mit einer ernstlichen Verfälschung der Digoxinspiegelbestimmung nicht zu rechnen. Kreuzreaktionen mit anderen Herzglykosiden oder Steroidhormonen (28,61) bzw. steroidartigen Medikamenten wie z.B. Spironolacton (9,52,57,82) sind beobachtet worden.

2.5. Hemmung der $^{86}$Rb-Aufnahme von Erythrozyten ($^{86}$Rb-Test)

Nachdem die Hemmung des transmembranären $Na^+$-$K^+$-Transportes durch Herzglykoside in bereits hohen Verdünnungen auch für Erythrozyten erkannt (92) und der Beweis für die Ersetzbarkeit von $K^+$ durch andere monovalente Kationen wie z.B. durch $Rb^+$ aus der gleichen chemischen Gruppe der Alkali-Elemente erbracht werden konnte (67), veröffentlichte 1965 LOWENSTEIN (68) eine Methode zur Bestimmung von Serumdigitoxinkonzentrationen. Die Einführung eines Extrak-

tionsschrittes verminderte den Einfluß von interferierenden Serumbestandteilen und erhöhte die Sensitivität des Tests (69), sodaß auch andere Herzglykoside bestimmt werden konnten. Die Nachweisempfindlichkeit der Methode liegt je nach Modifikation für Digitoxin und Digoxin bei o,2 - o,5 ng/ml; somit können auch therapeutische Digitalisspiegel quantitativ erfaßt werden.
1 - 1o ml Plasma (5,6,8,38,4o,69) werden mit Methylenchlorid extrahiert, der Extrakt verdampft, der Rückstand mit isotoner Natriumchlorid- oder Pufferlösung aufgenommen und zusammen mit einer bestimmten Menge von $^{86}Rb$ und gewaschenen Erythrozyten inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Erythrozyten wird die von ihnen aufgenommene $^{86}Rb$-Radioaktivität im Liquid-Szintillationszähler oder im Bohrlochzähler gemessen und anhand von simultan präparierten Eichstandards auf die Serumkonzentration geschlossen.
Der $^{86}Rb$-Test ist arbeits- und zeitaufwendiger als der RIA, hat aber wie der Enzymatic isotope displacement assay und der $Na^+$-$K^+$-ATPase-Hemmtest den Vorteil der Registrierung nur der biologischen Wirkung der zu bestimmenden Herzglykoside und ihrer Metabolite, sofern diese wie die Primärsubstanz kardioaktive Eigenschaften besitzen. Der $^{86}Rb$-Test kann für jedes Herzglykosid angewendet werden, sofern dieses genügend lipophil ist, um mit organischen Lösungsmitteln extrahiert zu werden (6,19,3o). g-Strophanthin z.B. ist nur gering in Chloroform oder Dichlormethan löslich und deshalb seine Bestimmung aus dem Serum mit der $^{86}Rb$-Methode nicht indiziert (6,47). Insofern ist die Universalität dieses Tests durch die Unsicherheit, hydrophile Herzglykoside und wasserlösliche kardioaktive Metabolite bei der Serumextraktion nicht zu erfassen, eingeschränkt (42) - dies gilt jedoch nicht für Glykosid-Modellstudien.

2.6. Hemmung der $Na^+$-$K^+$-aktivierbaren ATPase

Dieses Verfahren basiert wie der $^{86}Rb$-Uptake-Test auf der spezifischen Hemmung der Membran-ATPase durch alle herzwirksamen Steroide und ihre Metabolite. Entsprechend ist auch die Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat inhibiert. Bestimmt wird das freie Phosphat; aus dessen vermindertem Anfall wird die

Digitaliskonzentration der Serumprobe ermittelt. Das Verfahren wurde erstmals von BURNETT und CONKLIN 1968 beschrieben (18) und von anderen Untersuchern bestätigt (7,73).
5 ml Serum werden mit Methylenchlorid extrahiert. Der Extrakt wird verdampft, der Rückstand in eine gepufferte Elektrolytlösung, die Membran-ATPase aus Schweine- oder Rinderhirn enthält, aufgenommen. Nach einer kurzen Vorinkubation wird eine bestimmte Menge ATP zugesetzt und für 15 Minuten inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird mit einer eiskalten verdünnten Trichloressigsäurelösung gestoppt und das entstandene freie Phosphat bestimmt. Arbeits- und Zeitaufwand sind gering, die apparative Ausrüstung ist nicht groß. Die untere Nachweisgrenze der Originalmethode liegt bei 1 ng/ml, sodaß das Verfahren nur für Digitoxinbestimmungen geeignet ist - für Digoxinbestimmungen müßte von einem größeren Serumvolumen ausgegangen werden (6).

2.7. Enzymimmunoassay (EIA)

Gegenwärtig vollzieht sich die Entwicklung eines neuen immunologischen Testprinzips, das sich eines Enzyms zur Markierung anstatt eines Radionuklids wie beim Radioimmunoassay bedient und deshalb als Enzymimmunoassay (EIA) oder nicht-isotoper Immunoassay bezeichnet wird. Diese Methode wurde 1972 von RUBENSTEIN et al. (9o) beschrieben und in der Folgezeit zur quantitativen Bestimmung von verschiedenen Medikamenten wie z.B. Digoxin und Diphenylhydantoin im Serum und von Opiaten im Urin weiterentwickelt (2,93). Zur Untersuchung des Digoxinspiegels im Patientenserum werden ein Antikörper mit ausreichend hoher Spezifität gegen Digoxin und ein mit Digoxin markiertes Enzym benötigt. Diese Markierung kann durch eine chemische Bindung von Digoxin an z.B. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ohne Verlust ihrer Enzymaktivität erfolgen. Der gegen das Digoxin gerichtete Antikörper wird durch die Immunisierung von Schafen gewonnen, wobei Digoxin wegen seines geringen Molekulargewichtes nur als Hapten fungieren kann und deshalb mit einem höhermolekularen Protein, z.B. mit Gammaglobulin, gekoppelt werden muß.
2oo µl des zu untersuchenden Patientenserums werden im Doppelansatz mit Natronlauge versetzt, um störende Proteine zu dena-

turieren. Nach 5 Minuten fügt man eine bestimmte Menge Antikörper und das Enzymsubstrat, in diesem Fall Glucose-6-phosphat, und Nicotinadenindinucleotid in Puffer gelöst hinzu. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten, die aus arbeitstechnischen Gründen auch auf 2 Stunden ausgedehnt werden kann, ohne daß die Versuchsergebnisse verfälscht werden, wird eine bestimmte Menge der in Puffer gelösten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zugesetzt, die Extinktion bei 34o nm gemessen und bei 3o,o $^{o}$C inkubiert. Jeweils exakt 3o Minuten nach der ersten Messung werden die Extinktionswerte der Proben erneut bestimmt und ausgehend von den jeweiligen Extinktionsdifferenzen anhand einer mit jeder Testdurchführung zu erstellenden Eichkurve die Digoxinkonzentration abgelesen.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß der Antikörper sich mit dem im Patientenserum vorhandenen Digoxin verbindet, die je nach dem betreffenden Digoxingehalt überschüssige Antikörpermenge lagert sich an die Digoxin-markierte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase an und inaktiviert sie. Die nicht betroffenen Enzym-Moleküle reagieren mit ihrem Substrat Glucose-6-phosphat und setzen es zu Gluconsäurelacton-6-phosphat um, wobei das anwesende Nicotinadenindinucleotid quantitativ reduziert wird und nach der kinetischen Methode photometrisch bestimmt werden kann. Die Reduktion von Nicotinadenindinucleotid korreliert also direkt mit der in der Serumprobe vorhandenen Menge an Digoxin.

Der EIA als Methode ohne Serumextraktion und ohne Separationsschritte hat eine gute Reproduzierbarkeit bei einer unteren Nachweisgrenze von weniger als o,5 ng/ml für Digoxin; deshalb genügen bereits geringe Ausgangsmengen von Patientenserum. Die relativ einfache Durchführbarkeit, der geringe Zeit- und apparative Aufwand sind weitere Vorteile, die ihn besonders in klinischen Laboratorien ohne Geräteausrüstung zur Durchführung von radiochemischen Bestimmungsmethoden zur Routineuntersuchung geeignet erscheinen lassen, zumal auch der EIA durch die Industrie bereits als konfektionierter Kit angeboten wird.

Der EIA ist ein Test zum quantitativen Nachweis von freiem und proteingebundenem Digoxin im Serum, d.h. auch mit ihm wird gegenüber dem $^{86}$Rb-Test, der $Na^{+}$-$K^{+}$-ATPase-Hemmung und dem Enzy-

matic isotope displacement assay keine biologische Wirkspezifität, sondern wie beim RIA eine immunologische Strukturspezifität erfaßt. Da die Antikörperspezifität auf das Steroidgerüst des Digoxins gerichtet ist, können auch Substanzen, die sich nur gering von der Strukturformel her vom Digoxin unterscheiden, mit dem Antikörper reagieren und zu falsch positiven Ergebnissen führen.
Inwieweit der EMIT-Digoxin-Assay von der Firma Syva, Palo Alto, USA, von solchen strukturähnlichen Substanzen beeinflußt wird, soll Gegenstand der folgenden Untersuchung sein.

3. Versuchsdurchführung mit dem EMIT-Digoxin-Assay

Der EMIT-Digoxin-Assay wird als "homogener" Enzymimmunoassay bezeichnet, um ihn von anderen immunochemischen Methoden zu unterscheiden, die "heterogener" Art sind und physikalische Trennungsschritte bezüglich des freien und gebundenen Antigenanteils beinhalten (9o). Eine solche Trennung ist notwendig, wenn die Markierung sowohl in freiem als auch gebundenem Zustand bei der Bestimmung miterfaßt wird, wie dies z.B. bei der radioaktiven Markierung der Fall ist.

Der EMIT-Digoxin-Assay-Kit ist für 7o Bestimmungen einschließlich der Eichproben ausgelegt. Er enthält:

- o,5 N-Natronlauge
- Puffer-Lösung
  o,o55 M-Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4
  Das Pufferkonzentrat wird mit destilliertem Wasser auf 15o ml aufgefüllt und kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
- das Antikörper-/Substrat-Reagenz in lyophilisiertem Zustand mit Konservierungsmittel und o,o55 M-Tris-HCl-Puffer mit einem pH von 5,o. Durch Zugabe von 4,o ml destilliertem Wasser wird das Lyophilisat reaktiviert und ist bei einer Lagerung bei 1 - 8 °C 12 Wochen haltbar. Die Gebrauchslösung wird durch Zugabe von 24 Volumenteilen o,o55 M-Tris-HCl-Pufferlösung mit einem pH von 7,4 zu 1 Volumenteil der Reagenzlösung hergestellt und kann bei Raumtemperatur (2o - 25 °C) eine Woche aufbewahrt werden.
- die an Digoxin gekoppelte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in lyophilisiertem Zustand mit o,o55 M-Tris-HCl-Puffer bei einem pH von 7,9. Das Enzym wird durch Zugabe von 4,o ml destilliertem Wasser reaktiviert und sollte in Lösung bei 1 - 8 °C aufbewahrt werden, unter diesen Bedingungen ist es 12 Wochen stabil. Seine Aktivität ist auf das Antikörper-/Substrat-Reagenz abgestimmt. Die Gebrauchslösung erhält man durch Hinzufügen von 9 Volumenteilen o,o55 M-Tris-HCl-Pufferlösung mit einem pH von 7,4 zu 1 Volumenteil der Reagenzlösung. Sie ist 24 Stunden haltbar und sollte zur Benutzung am folgenden Tag über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- Digoxin-Eichlösungen

Die 6 Standards werden aus nicht-sterilem Humanserum ($HB_sAg$ negativ) hergestellt, liegen in lyophilisiertem Zustand vor und werden durch Zugabe von jeweils 3,o ml destilliertem Wasser regeneriert, wobei sie bei einer Lagerung bei 1 - 8 °C ungefähr 12 Wochen haltbar sind. In den mitgelieferten Auswertungsdiagrammen sind die jeweiligen effektiven Digoxin-Standard-Konzentrationen markiert.

Aus ökonomischen Gründen wurden die in der Vorschrift der Herstellerfirma genannten Volumina um die Hälfte erniedrigt, wodurch die Bestimmungsanzahl je Kit auf 14o einschließlich der Eichproben erhöht werden konnte, ohne daß das Bestimmungsergebnis beeinflußt wurde. Wegen des erniedrigten Endvolumens der Proben wurden Einmal-Halbmikroküvetten bei der photometrischen Auswertung benutzt. Somit ergibt sich folgender Testablauf, der in Abb. 1 schematisch dargestellt ist:

1oo µl der zu untersuchenden Serumprobe bzw. Standardlösung werden in Reagenzgläser pipettiert, 25 µl o,5 N-Natronlauge hinzugefügt, die Proben 1o Sekunden gemischt; nach 5 Minuten werden 625 µl der den Antikörper und die Substrate enthaltenden Gebrauchslösung zugesetzt und wiederum 1o Sekunden gemischt. Nach 15 Minuten werden 25o µl der die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase enthaltenden Gebrauchslösung zur ersten Probe zugegeben, kurz gemischt, dann die Extinktion mittels eines Photometers mit digitaler Ausgabe gemessen, die Zeit abgelesen und die Probe bei 3o ± o,1 °C inkubiert. Alle Proben eines Durchgangs werden auf diese Weise behandelt und jeweils genau 3o Minuten nach der ersten Extinktionsmessung einer zweiten Messung unterzogen. Bei den Standardproben werden die Extinktionsdifferenzen zwischen 2. und 1. Messung errechnet, der jeweilige Mittelwert gebildet und von ihm der Mittelwert der Extinktionsdifferenzen zwischen 2. und 1. Messung der Blindproben subtrahiert. Diese Werte werden gegen die bekannten Digoxinkonzentrationen in dem mitgelieferten Diagramm aufgetragen und die Eichgerade nach dem Prinzip der kleinsten quadratischen Abstände gezogen. Für die routinemäßige Anwendung des Tests genügt es, die Eichgerade am besten durch die Positionen für den Standard "1" und "4" zu ziehen. Liegt ein Punkt mehr als o,o1o Extinktionseinheiten außerhalb dieser Gera-

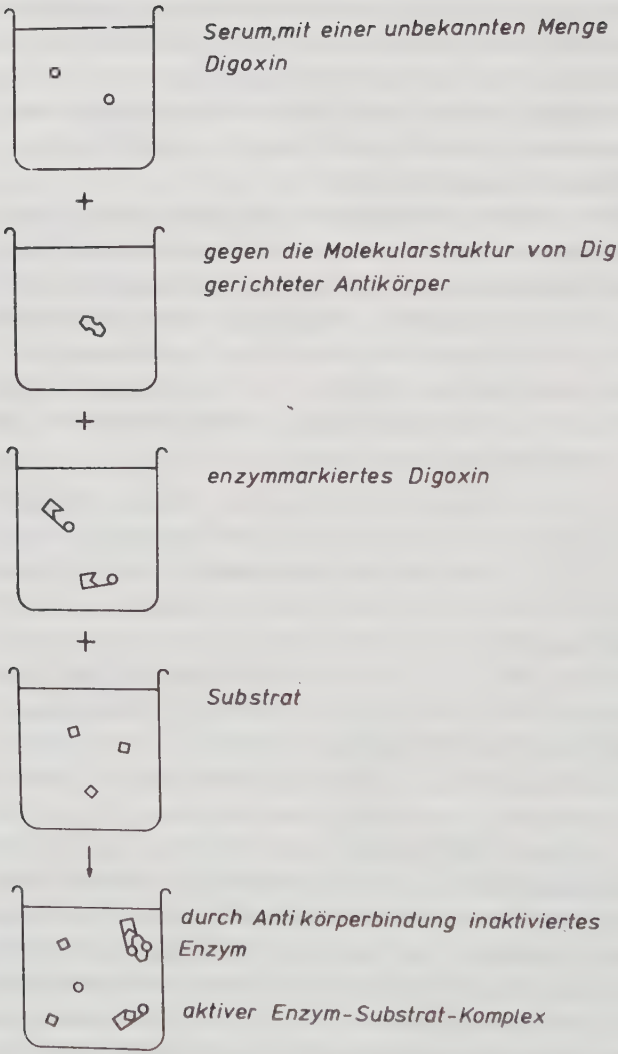



Abb. 1: Prinzip des Enzymimmunoassays am Beispiel des EMIT-Digoxin-Assays. Das Schema demonstriert die einzelnen aufeinander folgenden Reaktionsschritte.

den, so muß die Eichung wiederholt werden. Die Extinktionsdifferenz zwischen Standard "1" und "4" sollte nicht kleiner als o,o85 und zwischen Standard "o" und "1" nicht kleiner als o,o2o sein. Zur Ermittlung der Digoxinkonzentrationen in den zu untersuchenden Proben werden die jeweiligen Extinktionsdifferenzen zwischen 2. und 1. Messung gebildet, der Mittelwert errechnet und von ihm der Mittelwert der Extinktionsdifferenz zwischen 2. und 1. Messung der Blindproben subtrahiert, und dieser Wert mit der Eichgeraden verglichen. Das von der Firma Syva, USA, erstellte Diagramm zeigt auf der Abszisse die logarithmische Auftragung der Digoxinkonzentration, während sich die Einteilung der Ordinate aus der Formel

$$\log \frac{\Delta E}{k_c - \Delta E}$$

ergibt. $\Delta E$ stellt das jeweilige Ergebnis aus den oben beschriebenen Subtraktionen dar, $k_c$ ist eine Konstante mit dem Betrag 225, in der alle unabhängigen Größen dieses enzymkinetischen Meßverfahrens enthalten sind.
Vor jeder Versuchsreihe wurde das Photometer mit destilliertem Wasser auf die Extinktion o,ooo abgeglichen und während der Untersuchung mehrfach überprüft. Die Messungen wurden abweichend von der Vorschrift nicht bei 34o nm, sondern bei 334 nm durchgeführt. Dies hat zwar eine Abnahme des molaren Extinktionskoeffizienten des in reduzierter Form vorliegenden Nicotinadenindinucleotids von 6,3o auf 6,18 zur Folge, wirkt sich jedoch bei diesem geringen Ausmaß noch nicht auf die Ablesegenauigkeit aus. Alle Serumproben einschließlich der Eichstandards wurden Vierfachbestimmungen unterzogen. Obwohl sich der Nachweisbereich des EMIT-Digoxin-Assays von o,5 bis 4,o ng/ml mit einem Variationskoeffizienten kleiner als 1o% erstreckt, wurde die Konzentration aller untersuchten Substanzen auf 1,o ng/ml, 5,o ng/ml, 1o,o ng/ml, 1oo,o ng/ml und 1ooo,o ng/ml festgelegt, einmal, um festzustellen, wie der Test bei diesen hohen Dosen reagiert und um gleiche Bezugswerte für alle getesteten Substanzen zu erhalten, die natürlich außerhalb des Testbereichs nicht absolut interpretiert werden dürfen; zum zweiten, um auch solche Kreuzre-

aktionen zu erfassen, die erst in höheren Konzentrationsbereichen auftreten.
Die Serumproben wurden unter Verwendung von $HB_sAg$-negativem Poolserum angesetzt, das bei seiner Überprüfung mit dem EMIT-Digoxin-Assay keine positive Reaktion zeigte.
Zusätzlich wurde der Test auf Interferenzen von hämolytischen, ikterischen, lipämischen und urämischen Seren, die in der ersten Versuchsanordnung frei von Digoxin, in einer zweiten jedoch mit 1,25 ng/ml Digoxin präpariert waren, überprüft.

## 4. Übersicht über die untersuchten Substanzen

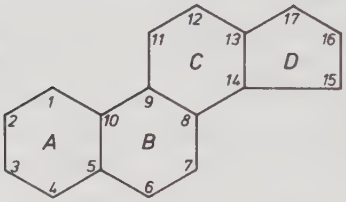
### 4.1. Cardenolide

Die herzwirksamen Glykoside sind chemisch durch einen sehr spezifischen Aufbau charakterisiert: durch anorganische Säurehydrolyse zerfallen sie in einen Zucker- und Geninanteil - auch Aglykon genannt. Besitzt das Aglykon einen 5-gliedrigen Lactonring, spricht man von Cardenoliden (46). Auf das Genin ist hauptsächlich die Herzwirkung zurückzuführen. Die Genine gehören zur Klasse der Steroide und enthalten als solche das Steroidgerüst mit 4 kondensierten Ringen, die fast immer zum Cyclopentanoperhydrophenanthren (Abb. 2) hydriert sind (nur wenige Verbindungen besitzen wie das Cholesterin eine Doppelbindung zwischen den Ringen A und B). Über das $C_{17}$-Atom ist noch ein weiterer Ring in Form eines ungesättigten 5-gliedrigen Lactonringes angefügt. Die einzelnen Ringe sind nicht in einer Ebene, sondern sterisch miteinander verknüpft und in sich räumlich gefaltet zur energiearmen Sesselform. Diese Konformation ist ausschlaggebend für die kardiale Wirksamkeit. Der Begriff Cardenolid kennzeichnet bereits eine Zuordnung der Ringe A und B, C und D in cis-, der Ringe B und C in trans- und des Ringes E in ß-Stellung.

Analog nehmen auch die Substituenten eine räumliche Stellung zur Steroidkonfiguration ein, sie stehen überwiegend in ß-Stellung, so z.B. die $CH_3$- und OH-Gruppen sowie die Zuckerkette für Digitoxigenin und Digoxigenin. Der Zuckeranteil der Digitalis-Cardenolide besteht meistens aus 3 Mol D-Digitoxose wie beim Digitoxin und Digoxin (Abb. 3); selten kommt auch 1 Mol D-Glucose vor wie beim Lanatosid C. Die Pflanze bildet D-Digitoxose als sogenannten Desoxyzucker aus D-Glucose durch Reduktion von 2 OH-Gruppen. Seltener werden glykosidische Bindungen mit L-Zuckern wie mit der L-Oleandrose und L-Rhamnose, z.B. im g-Strophanthin, eingegangen.

Die Vollsynthese dieser Stoffe ist auch in vitro möglich (26,29, 46), wodurch die Palette von Glykosiden noch durch eine Vielzahl von Verbindungen erweitert werden kann, die primär in der Natur nicht vorkommen. Eine industrielle Produktion ist wegen zu geringer Ausbeute und zu vieler Syntheseschritte nicht angelaufen.

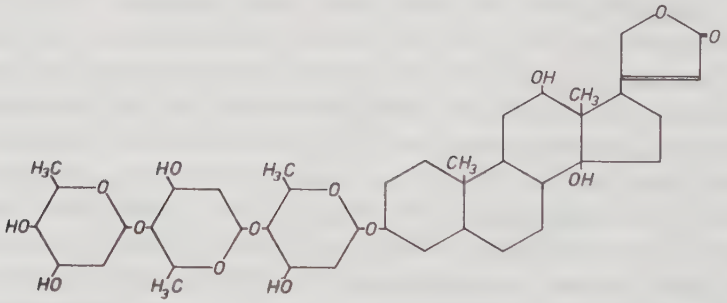
*Steran (=Cyclopentanoperhydrophenanthren)*




$C_{17}H_{28}$ 232,41

Abb. 2: Grundgerüst der Cardenolide, bestehend aus den 4 Ringen A, B, C, D, von denen der letzte ein 5-gliedriger ist. Am $C_{17}$-Atom wird der Lactonring und am $C_3$-Atom die Zuckerkette gebunden.

*Digoxin*




$C_{41}H_{64}O_{14}$ 780,96

Abb. 3: Struktur- und Summenformel sowie Molekulargewicht von Digoxin.

Für wissenschaftliche Fragestellungen und für die Grundlagenfor-

schung wurden Substitutionen - insbesondere von OH-, Methyl- und Acetyl-Gruppen - an verschiedenen C-Atomen des Cardenolidgerüstes oder an Zuckermolekülen der D- oder L-Reihe in α- oder ß-Glykosidbindung vorgenommen. Die substituierten Verbindungen zeigten gegenüber der Ausgangssubstanz Unterschiede in der Herzwirksamkeit und/oder Resorbierbarkeit.

Die systematische tierexperimentelle Testung einer Vielzahl von Cardenoliden, ihrer Glykoside und substituierten Derivate ließ bestimmte Struktur-Wirkungsbeziehungen erkennen, die jedoch quantitative Speciesunterschiede bei Hund, Katze, Meerschweinchen, Ratte und Mensch aufwiesen. Grundsätzlich gilt, daß Konstitution und Konformation des Genins die inotrope Wirkung bestimmen (3,17,99). Der kardiotone Effekt wird durch die Zuckerkette verstärkt. Im Gegensatz zu früheren Auffassungen steht heute fest, daß prinzipiell keine qualitative, sondern nur quantitative Unterschiede in der Herzwirkung der verschiedenen Cardenolide und ihrer Glykoside bestehen, die aus der verschieden großen Verweildauer der Herzsteroide im Organismus resultieren und die die Basis für den klinischen Begriff der Kumulation bilden (41,43,6o,89,94,1o4).

Als bemerkenswertes Forschungsergebnis der letzten Jahre ist die Verbesserung der enteralen Resorption von Herzglykosiden durch Acetylierung und Methylierung z.B. der endständigen Digitoxose des Digoxins zu verbuchen, durch die eine größere Lipophilität erreicht worden ist.

Die Einfügung von OH-Gruppen kann die biologische Wirksamkeit - gemessen an der $LD_{50}$ in mg/kg - steigern, wie OH-Substitutionen an den C-Atomen 11, 12 und 19 des Digitoxingenins bestätigt haben (22,49,5o). Andererseits verursachen OH-Substitutionen an anderen C-Atomen des Steroidgerüstes, z.B. an $C_{1,5,7,15,16,17}$, eine Wirkungsabschwächung (3,14,49,54,56,87). Am Beispiel der OH-Substitution erweist sich sehr deutlich das bereits von den Steroidhormonen der Nebenniere und der Isomerie der Enzyme her bekannte Phänomen der Struktur-Wirkungsbeziehung; nicht nur der Substituent an sich, sondern vielmehr seine stereometrische Position bedingt die biologische Wirkung.

Ebenso wie die Hydroxylierung kann eine Veresterung von OH-Grup-

pen die kardiale Wirkung verstärken oder abschwächen.
An der Zuckerkette führen Änderungen ihrer sterischen Anordnung oder Austausch des L- gegen das D-Isomer einheitlich zu einer Reduktion der inotropen Effektivität (49,113,114).
Die in $C_3$ stehende OH-Gruppe ist von wesentlicher Bedeutung für die pharmakodynamische Wirkung des Genins. Bei Änderung ihrer sterischen Position oder bei Dehydrierung zur Ketogruppe erlischt der kardiotone Effekt.
Eine Achillesferse der Cardenolide stellt die OH-Gruppe in $C_{14}$ dar. Diese unterliegt leicht einer Säurehydrolyse mit Auftreten einer Doppelbindung oder Lageänderung des Pentanringes, wodurch die inotrope Wirkung vollständig aufgehoben wird (17); das gleiche gilt für die Abspaltung der $C_{16}$-ständigen OH-Gruppe.
Der Lactonring ist von besonderer Bedeutung für die kardiale Wirkung der Cardenolide (86). Allein die sterische Transformation in die 17 -Position hebt die Wirkung vollständig auf. Die Hydrierung der Doppelbindung des Lactonringes zu Dihydroderivaten schwächt die Wirkung sowohl am intakten Tier als auch am Herz-Lungen-Präparat und am isolierten Herzmuskel erheblich ab (1,17,21,86). Das Vorkommen solcher Dihydroderivate als Metabolite wird auch in vivo vermutet (86). Interessant ist an diesen hydrierten Cardenoliden ihre größere therapeutische Breite (1o1), deren Ursache REPKE (86) - übereinstimmend mit anderen Untersuchern (112) - ohne erkennbare metabolische Unterschiede in einer geringeren Assoziation am spezifischen Rezeptor und in einer besseren Penetration durch die Zellmembran sieht. In der Kardiologie haben sich Dihydroderivate wegen ihrer zu flüchtigen Wirkung nicht bewährt (87).

In die Herztherapie sind Aglykone nicht eingeführt worden, obwohl sie am isolierten Herzmuskel kardiotone Effekte hervorrufen. Die Ursache für ihre therapeutische Unbrauchbarkeit liegt in der schnellen Umsetzung im Organismus zu unwirksamen Metaboliten. Allein die Zuckerkette in den Glykosiden sichert ihre therapeutische Verwendbarkeit. Diese Zuckerkette, die interessanterweise im Pflanzenreich nicht gespalten werden kann, verzögert im Tierorganismus den Metabolismus - Hydroxylierung, stufenweiser Zuckerabbau, Umlagerung - wofür besonders das Digito-

xin mit seinen 3 Mol D-Digitoxose ein Beispiel ist (84,98,11o).

Ein ideales Herzglykosid mit guter enteraler Resorption bzw. enteraler oder oraler Wirksamkeit (87) hat 3 Kriterien zu erfüllen:

1. Wasserlöslichkeit (75,85)
   Eine schnelle Lösung im Darmsaft ist eine Vorbedingung für eine effektive Resorption.
2. Lipidlöslichkeit (74,75,85)
   Diese ist Voraussetzung für die Überwindung der lipoiden Grenzbarriere des Darmtraktes. Mit steigender Lipidlöslichkeit (fallender Polarität) nimmt die Penetration durch die Mukosa zu und die Elimination über Harn und Galle pro Zeit ab. Eine gute Resorbierbarkeit setzt ein Minimum von Hydroxylgruppen voraus (46). Die Höhe des Digitalisspiegels im Blut und in den Geweben als Maß für die enterale Wirksamkeit wird von den relativen Geschwindigkeiten der Resorption und Ausscheidung bestimmt. Acetylierung und Methylierung verbessern die Lipidlöslichkeit und können daher die enterale Wirksamkeit steigern. Eine Desacetylierung erfolgt bereits in der Mukosa während der Resorption, wodurch das natürliche Glykosid im Blut erscheint (44,87).
3. Stabilität (75)
   Eine langsame Metabolisierung sichert eine über die Zeit genügend lange Blut- und auch Gewebskonzentration.

Digoxin:

Digoxin, 3ß,12ß,14-Trihydroxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid-3-tridigitoxosid mit der Summenformel $C_{41}H_{64}O_{14}$, ist ein Sekundärglykosid aus Digitalis lanata EHRHARDT aus der Familie der Scrophulariaceae. Es entsteht aus dem genuinen Glykosid Lanatosid C durch Abspaltung von 1 Mol Glucose und der Acetylgruppe und besteht somit aus dem Genin Digoxigenin und 3 Mol Digitoxose. Es ist sowohl gut wasser- als auch lipidlöslich, woraus eine enterale Resorption von 5o - 7o % resultiert. Das Wirkungsmaximum wird nach oraler Zufuhr nach 8 Stunden, bei intravenöser Applikation nach 3 Stunden erreicht, wobei hier schon nach 5 - 2o Minuten die Wirkung einzusetzen beginnt. Die Abklingquote beträgt ungefähr

2o - 3o %, wobei Digoxin nach oraler oder parenteraler Zufuhr beim Menschen, abgesehen von kleinen initial über die Galle in Form wasserlöslicher Metabolite ausgeschiedenen Anteilen, praktisch unverändert im Urin erscheint. Somit wird die Eliminationsgeschwindigkeit weitgehend durch die renale Ausscheidung bestimmt. Digoxin liegt als Monosubstanz in den Präparaten Lanicor$^{R}$ und Digacin$^{R}$ vor, außerdem findet es in zahlreichen Kombinationspräparaten Verwendung.

Digoxigenin:

Digoxigenin, 12ß-Hydroxy-digitoxigenin mit der Summenformel $C_{23}H_{34}O_5$, ist das Genin des genuinen Glykosids Lanatosid C aus Digitalis lanata EHRHARDT und den daraus entstehenden Sekundärglykosiden Acetyldigoxin, Digoxin und Desacetyllanatosid C. In die Therapie wurde es nicht eingeführt, da es als Aglykon einer zu schnellen Umsetzung im Organismus zu unwirksamen Metaboliten unterliegt.

α-Acetyldigoxin:

Acetyldigoxin besteht aus dem Genin Digoxigenin, 3 Mol Digitoxose und einer Acetylgruppe am endständigen Zuckermolekül. Es kommt in zwei isomeren Formen vor, die sich u.a. durch ihre optische Drehung und ihre verschiedene Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln unterscheiden. Acetyldigoxin, das 3ß,12ß,14-Trihydroxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid-3-monoacetyldigitoxosid mit der Summenformel $C_{43}H_{66}O_{15}$, kann durch enzymatische Abspaltung eines Mols Glucose aus dem Lanatosid C (α-Acetyldigoxin) oder durch Acetylierung von Digoxin (z.B. ß-Acetyldigoxin) gewonnen werden. Das in 3-Stellung der endständigen Digitoxose acetylierte Digoxin wird als α-Acetyldigoxin, das in 4-Stellung acetylierte als ß-Acetyldigoxin bezeichnet. Die beiden Isomeren lagern sich in Gegenwart von Wasser ineinander um, wobei sich ein Gleichgewicht von ca. zwei Teilen der α-Form und einem Teil der ß-Form einstellt. Die Acetylierung steigert die Lipidlöslichkeit und damit die enterale Resorption. Allerdings ist die Stabilität des α-Acetyldigoxins eingeschränkt, denn durch Magensäure oder Esterasen des Darmsaftes setzt bereits vor der Resorption die Abspaltung der als Gleitschiene gedachten Acetylgruppe an der

endständigen Digitoxose ein (86), wodurch teilweise das natürliche Glykosid Digoxin im Blut erscheint (46,87). Die Resorptionsquote des α-Acetyldigoxins liegt bei 8o %, die Abklingquote bei 2o %. Als Monosubstanz liegt es in den beiden Handelspräparaten Dioxanin$^{R}$ und Lanadigin$^{R}$ vor.

ß-Methyldigoxin:

ß-Methyldigoxin, 3ß,12ß,14-Trihydroxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid-3-monomethyltridigitoxosid mit der Summenformel $C_{42}H_{66}O_{14}$, stellt ein halbsynthetisches Glykosid dar, das aus Digoxin durch Methylierung am $C_4$-Atom der endständigen Digitoxose gewonnen wird. Die Methylierung verbessert die Lipidlöslichkeit und steigert daher die enterale Wirksamkeit. Die Resorptionsquote liegt bei 8o - 9o %, die Abklingquote beträgt etwa 2o %. Nach intravenöser Injektion tritt die Herzwirkung innerhalb 4 - 7 Minuten ein, nach oraler Gabe ist nach 1o - 2o Minuten mit dem ersten klinischen Effekt zu rechnen. Im Urin lassen sich nach Gaben von radioaktiv markiertem ß-Methyldigoxin sowohl die Ausgangssubstanz als auch Digoxin in individuell wechselndem Mengenverhältnis nachweisen.

Dimethyldigoxin:

Dimethyldigoxin, 3ß,12ß,14-Trihydroxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid-3-dimethyltridigitoxosid mit der Summenformel $C_{43}H_{68}O_{14}$, ist ein halbsynthetisches Glykosid mit Methylgruppen am $C_3$- und $C_4$-Atom der endständigen Digitoxose mit einer guten Lipidlöslichkeit. Bei der intravenösen Infusion beträgt die $LD_{5o}$ beim Meerschweinchen 1,46 mg/kg (im Vergleich ß-Methyldigoxin $LD_{5o}$: 1,36 mg/kg).

Dihydrodigoxin:

Dihydrodigoxin mit der Summenformel $C_{41}H_{66}O_{14}$ entsteht aus Digoxin durch Hydrierung der Doppelbindung des Lactonringes. Die therapeutische Breite dieser Substanz ist zwar größer, sie kann jedoch wegen ihrer zu kurzen Wirkungsdauer nicht zur Behandlung der Herzinsuffizienz Verwendung finden.

Dihydro-ß-methyldigoxin:

Dihydro-ß-methyldigoxin mit der Summenformel $C_{42}H_{68}O_{14}$ leitet sich vom Digoxin ab, wobei am $C_4$-Atom der endständigen Digitoxose eine Methylgruppe eingeführt und die Doppelbindung des Lac-

tonringes hydriert wurde. Bei der intravenösen Infusion bei Katzen ergibt sich eine $LD_{50}$ von 7,49 mg/kg (im Vergleich ß-Methyldigoxin $LD_{50}$: o,33 mg/kg). Durch die Substitution der Methylgruppe wurde zwar die Lipidlöslichkeit verbessert, die therapeutische Breite ist ebenfalls vergrößert; jedoch können diese Vorteile zur Therapie wegen der geringen Wirkungszeit der Dihydroderivate der Glykoside nicht genutzt werden.

Lanatosid C:

Lanatosid C mit der Summenformel $C_{49}H_{76}O_{2o}$ ist ein genuines Glykosid aus Digitalis lanata EHRHARDT. Es besteht aus dem Genin Digoxigenin, 3 Mol Digitoxose, 1 Mol Glucose und einem Acetylrest. Lanatosid C besitzt eine schlechte Lipidlöslichkeit, die aus dem seitenständigen polaren Glucosemolekül in der Zuckerkette resultiert. Infolgedessen ist die enterale Resorption verlangsamt und die biliäre und renale Ausscheidung beschleunigt. Erst in den distalen Darmabschnitten setzt eine bakterielle Desglucosylierung und Desacetylierung ein, wodurch enteral Digoxin metabolisiert wird, das sowohl wasser- als auch lipidlöslich ist und effektiv resorbiert wird. Das Ergebnis ist eine verzögerte Resorption bei Tier und Mensch (27,1o9); erst nach einer Latenz von 6 Stunden kommt es zu einem ansteigenden Glykosidspiegel, der in Wirklichkeit ein Digoxinspiegel ist. Die Resorptionsquote von Lanatosid C beträgt nach oraler Applikation 2o - 4o %, die Abklingquote 2o %. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend in Form von Digoxin durch die Nieren. Lanatosid C liegt als Monosubstanz in den Präparaten Cedilanid$^R$, Lanatosid$^R$ und Lanimerck$^R$ vor.

Gitoxin:

Gitoxin, 3ß,14,16ß-Trihydroxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid-3-tridigitoxosid mit der Summenformel $C_{41}H_{64}O_{14}$, ist ein Sekundärglykosid aus Digitalis lanata EHRHARDT und Digitalis purpurea L., wo es eines der Hauptglykoside darstellt. Es besteht aus dem Genin Gitoxigenin und 3 Mol Digitoxose. Als Reinsubstanz findet es keinen Eingang in die Therapie der Herzinsuffizienz wegen schlechter Löslichkeits- und Resorptionsverhältnisse. Bei oraler Verabreichung ist es z.B. unwirksam, da es weder wasser- noch lipidlöslich ist.

16-O-Acetylgitoxin:

16-O-Acetylgitoxin, 3ß,14-Dihydroxy-16ß-acetoxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid-3-tridigitoxosid mit der Summenformel $C_{43}H_{66}O_{15}$, ist durch die Acetylierung am $C_{16}$-Atom etwas besser lipidlöslich, spielt allerdings in der Glykosidtherapie kaum eine Rolle. In dem Präparat Resorptol$^R$ liegt es als Monosubstanz vor.

Neriifolin:

Neriifolin bzw. Oleandrin ist ein herzwirksames Glykosid aus Nerium oleander aus der Familie der Apocynaceae. Es besteht aus dem Aglykon Oleandrigenin (16-O-Acetylgitoxigenin) und 1 Mol Oleandrose. Die Wirkung ist Digitalis-ähnlich. In der Therapie wird vorwiegend ein Gesamtextrakt aus den Blättern der Stammpflanze verwendet.

Pentaacetylgitoxin:

Pentaacetylgitoxin oder Pengitoxin (INN), 16ß-Acetoxy-14-hydroxy-3ß(tetraacetyl-tridigitoxosyloxy)-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid mit der Summenformel $C_{51}H_{74}O_{19}$, stellt ein fünffach acetyliertes teilsynthetisches Gitoxin dar. Vier Acetylgruppen befinden sich an den drei Digitoxosemolekülen und eine Acetylgruppe am $C_{16}$-Atom des Gitoxigeninmoleküls. Pentaacetylgitoxin erfährt nach der Resorption bei oraler Gabe eine komplette Desacetylierung. Die therapeutischen Erfahrungen sind noch begrenzt. Die Resorptionsquote wird mit 62 % angegeben, die Abklingquote mit 7 - 15 %. Als Monosubstanz steht Pentaacetylgitoxin in den Präparaten Cordoval$^R$ und Pentagit$^R$ zur Verfügung.

Lanadoxin:

Lanadoxin oder Formylgitoxigenin-mono-digitoxosid mit der Summenformel $C_{3o}H_{44}O_9$ kommt in den Blättern von Digitalis-Arten, insbesondere Digitalis lanata EHRHARDT, vor. Es ist teilsynthetisch auch aus Gitoxigenindigitoxosid herstellbar.

Digitoxin:

Digitoxin, 3ß,14-Dihydroxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid-3-tridigitoxosid mit der Summenformel $C_{41}H_{64}O_{13}$, stellt ein Sekundärglykosid aus Digitalis purpurea L., Digitalis lanata EHRHARDT und anderen Digitalis-Arten dar. Es besteht aus dem Genin Digitoxigenin und 3 Mol Digitoxose. Digitoxin entsteht aus einem der

Hauptglykoside von Digitalis purpurea L., dem genuinen Purpureaglykosid A, durch Abspaltung von 1 Mol Glucose und aus Lanatosid A von Digitalis lanata EHRHARDT durch Abspaltung von 1 Mol Glucose und der Acetylgruppe. Da Digitoxin gut lipidlöslich ist und eine genügend hohe Stabilität besitzt, hat es eine gut enterale Wirksamkeit. Nach oraler Gabe ist das Wirkungsmaximum nach 12 Stunden erreicht; bei intravenöser Applikation findet sich das Wirkungsmaximum schon nach 8 Stunden, wobei das Einsetzen der Wirkung nach 3o - 6o Minuten festzustellen ist. Die Resorptionsquote beträgt 1oo %, die Abklingquote 7 - 1o %. Nach der Resorption wird Digitoxin über die Niere (8o %) und die Galle teils in Form wasserlöslicher Metabolite, teils unverändert ausgeschieden. Obwohl der metabolische Abbau von Digitoxin wesentlich schneller erfolgt als die Wirkung einer Gabe dieses Glykosids abklingt, erklärt sich die niedrige Abklingquote von 1o % durch das Auftreten von herzwirksamen Metaboliten und durch die Depotwirkung, die das Kreisen des Digitoxins im enterohepatischen Kreislauf erzeugt und es damit einer endgültigen Ausscheidung entzieht. Digitoxin liegt als Monosubstanz in den Präparaten Digilong$^{R}$, Digimerck$^{R}$ und Lanatoxin$^{R}$ vor.

Digitoxigenin:

Digitoxigenin, 3ß,14-Dihydroxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid mit der Summenformel $C_{23}H_{34}O_4$, ist das Genin der genuinen Glykoside Lanatosid A aus Digitalis lanata EHRHARDT und Purpureaglykosid A aus Digitalis purpurea L. und der daraus entstehenden Sekundärglykoside wie Acetyldigitoxin und Digitoxin. Trotz schneller und vollständiger Resorption bei enteraler Verabreichung kann sich kein genügend hoher Wirkspiegel im Blut bilden, da Digitoxigenin als Aglykon sehr schnell metabolisiert wird.

Thevetin:

Thevetin ist ein Glykosid aus den Früchten von Thevetia neriifolia JUSSIEU aus der Familie der Apocynaceae mit der Summenformel $C_{42}H_{66}O_{18}$. Es besteht aus dem Aglykon Digitoxigenin, an dessen OH-Gruppe in 3-Stellung 1 Mol Thevetose (6-Desoxy-3-O-methyl-6-Glucose mit der Summenformel $C_7H_{14}O_5$) und 1 Mol des Disaccharids Gentiobiose in glykosidischer Bindung angelagert sind. Gentiobi-

ose mit der Summenformel $C_{12}H_{22}O_{11}$, 6-O-(ß-D-Glucopyranosyl)-D-glucose, und dem Synonym Amygdalose ist eine 6-Glucosidoglucose, in der die beiden Traubenzuckermoleküle ß-glucosidisch verbunden sind. Thevetin besitzt eine Strophanthin-ähnliche Wirkung, ist aber weniger giftig, wirkt schnell und wird rasch ausgeschieden; eine Kumulation tritt nicht ein. Einer breiteren therapeutischen Anwendung steht der laxierende Effekt des Glykosids entgegen.

Dihydrodigitoxin:

Dihydrodigitoxin mit der Summenformel $C_{41}H_{67}O_{13}$ entsteht aus Digitoxin durch Hydrierung der Doppelbindung des Lactonringes. Wie bei Dihydrodigoxin ist die therapeutische Breite zwar größer, jedoch ist die Wirkungsdauer auch dieser Substanz so kurz, daß sie keine Verwendung in der Therapie der Herzinsuffizienz finden kann.

g-Strophanthin:

g-Strophanthin, das 1ß,5,11$\alpha$,14,19-Pentahydroxy-3ß-$\alpha$-L-rhamnosyloxy-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid mit der Summenformel $C_{29}H_{44}O_{12} \times 8\ H_2O$, (Synonyma Acocantherin und Ouabain), besteht aus dem Genin g-Strophanthidin (Synonym Ouabagenin) und 1 Mol Rhamnose. Es stellt das Hauptglykosid aus Strophanthus gratus FRANCHET aus der Familie der Apocynaceae dar. Bei intravenöser Applikation setzt die Wirkung nach 3 - 1o Minuten ein und erreicht nach 1 Stunde ihr Maximum. Die Resorption nach oraler Applikation wurde beim Meerschweinchen und bei gesunden Versuchspersonen mit 7 - 15 % der applizierten Dosis bestimmt. Trotz der geringen Resorption lassen sich beim Meerschweinchen 9o % der zugeführten Menge in der Darmschleimhaut nachweisen. Das g-Strophanthin dringt zwar in das Epithel der Darmschleimhaut ein, wird jedoch von dort nicht in Richtung Blutbahn weitertransportiert. Die enterale Unwirksamkeit beruht auf der hohen Polarität des Strophanthins und damit seiner geringen Lipidlöslichkeit. Die Abklingquote liegt zwischen 6o und 9o %. g-Strophanthin wird metabolisch nicht verändert und wegen der hohen relativen Wasserlöslichkeit schnell durch die Nieren ausgeschieden. Durch Lebererkrankungen wird die Exkretion daher nicht, durch eine Niereninsuffizienz jedoch beträchtlich eingeschränkt (63). Im Handel

ist g-Strophanthin als Monosubstanz in den Präparaten Purostrophan$^{R}$ und Strodival$^{R}$.

k-Strophanthin:

k-Strophanthin ist keine einheitliche Substanz, sondern besteht aus drei Hauptglykosiden, die aus Strophanthus kombé OLIVER aus der Familie der Apocynaceae stammen:

k-Strophanthin-$\alpha$ ist Strophanthidin-3-cymarosid, d.h. es besteht aus dem Aglykon Strophanthidin (Synonyma Apocynamarin und Convallatoxigenin), 3ß,5,14-Trihydroxy-19-oxo-5ß,14ß-card-2o(22)-enolid, und 1 Mol Cymarose (2,6-Didesoxy-3-O-methyl-D-ribohexose). Meistens wird dieses Glykosid Cymarin genannt und unterscheidet sich von den beiden anderen durch seine bessere enterale Resorption.

k-Strophanthin-ß ist Strophanthin-3-strophanthobiosid und besteht aus dem Aglykon Strophanthidin und Strophanthobiose, einem Disaccharid aus D-Cymarose und im Glykosid endständiger ß-Glucose.

k-Strophanthin-$\gamma$ ist Strophanthidin-3-strophanthotriosid und besteht aus dem Aglykon Strophanthidin und Strophanthotriose, einem Trisaccharid aus D-Cymarose, ß-Glucose und im Glykosid endständiger $\alpha$-Glucose. Ein Synonym für diese Substanz ist genuines k-Strophanthosid.

Die Glykosidbildung erfolgt in allen Fällen an der OH-Gruppe in 3-Stellung. Im allgemeinen wird unter k-Strophanthin eine Glykosid-Mischung verstanden, die vorwiegend k-Strophanthin-$\gamma$ enthält. Wie bei g-Strophanthin setzt bei k-Strophanthin nach intravenöser Applikation die Wirkung nach 3 - 1o Minuten ein und erreicht nach 1 Stunde ihr Maximum. Die Abklingquote beträgt 6o - 9o %. Bei oraler Anwendung wird Cymarin in gerade noch ausreichendem Maß enteral resorbiert. k-Strophanthin-ß und k-Strophanthin-$\gamma$ haben eine für therapeutische Zwecke zu geringe enterale Resorbierbarkeit mit einer erheblichen Schwankungsbreite; auch die sublinguale Applikation beinhaltet unberechenbare Resorptionsbedingungen. Aus diesen Gründen wird Strophanthin kaum zur Dauertherapie verwendet, da zu diesem Zweck oral besser resorbierbare Glykoside zur Verfügung stehen. Cymarin wird unverändert ausgeschieden, während k-Strophanthin-ß und k-Stro-

phanthin-γ so lange im enterohepatischen Kreislauf verweilen, bis sie nach Abspaltung von einem bzw. zwei Molekülen Glucose als Cymarin die Leberschranke zu passieren vermögen (91). Eine Veränderung der Glykoside durch Abspaltung von Zuckermolekülen findet pH-abhängig auch im Magensaft statt.
In Deutschland wird meistens das k-Strophanthin dem g-Strophanthin vorgezogen. Als Monosubstanz liegt Cymarin in dem Präparat Alvonal MR$^R$, k-Strophanthin-ß in Kombetin$^R$ und k-Strophanthin-γ in Strophoral$^R$ und Strophosid$^R$ vor.

Convallatoxin:

Convallatoxin ist das Hauptglykosid aus Convallaria majalis L. aus der Familie der Liliaceae. Chemisch stellt es ein L-Rhamnosid des k-Strophanthidins mit der Summenformel $C_{29}H_{42}O_{10}$ dar. Die Herzwirkung der Substanz ist groß, jedoch wegen der schlechten enteralen Resorbierbarkeit und wegen der enzymatischen Zersetzung beim pharmazeutischen Aufbereitungsprozeß in der Therapie ungleichmäßig. Convallatoxin hat zwar eine sehr geringe Kumulationsneigung, doch die Toxizität ist sehr hoch. Im Handel lag Convallatoxin in dem Präparat Convallaton$^R$ als Monosubstanz vor.

4.2. Bufadienolide

Zu den Bufadienoliden gehören u.a. Glykoside aus der Meerzwiebel (Urginea maritima BAKER aus der Familie der Liliaceae), der Schwarzen Nieswurz (Helleborus niger L. aus der Familie der Ranunculaceae) und aus den Sekreten von verschiedenen Krötenarten. Von den Cardenoliden unterscheiden sich die Bufadienolide in ihrer chemischen Struktur durch einen 6-gliedrigen Lactonring am $C_{17}$-Atom des Aglykons, der doppelt ungesättigt ist, sowie durch eine Ester- anstatt Glykosidbindung (59).

Proscillaridin A:

Proscillaridin A ist ein Hauptglykosid aus Urginea maritima BAKER. Chemisch stellt es ein Rhamnosid des Genins Scillarenin mit der Summenformel $C_{24}H_{32}O_4$ dar und entsteht aus dem Scillaglykosid A durch Abspaltung von 1 Mol Glucose. Die Resorptionsquote liegt bei 25 %, wobei eine größere Schwankungsbreite einkalku-

liert werden muß, die Abklingquote bei 32 - 50 %. Bei oraler Gabe setzt die Wirkung nach 45 - 60 Minuten ein. Zur therapeutischen Anwendung kommen sowohl die Gesamtextrakte der Stammpflanze als auch das Reinglykosid, wobei die intravenöse Applikation vorzuziehen ist. Die Kumulationsneigung des Proscillaridin A ist sehr gering einzuschätzen.

4.3. Steroidhormone

Die Hormone aus der Nebennierenrinde und den Gonaden bilden die Gruppe der Steroidhormone. Sie lassen sich wie die Herzglykoside auf das Cyclopentanoperhydrophenanthren-Gerüst zurückführen. Während bei den Herzglykosiden die Ringverknüpfung in der sterischen Anordnung AB cis, BC trans, CD cis vorliegen muß, damit die Herzwirksamkeit vorhanden ist, sind die Ringe in den Steroidhormonen BC trans und CD trans verknüpft (s.a. Abb. 1).
Die Steroidhormone lassen sich in vier funktionelle Gruppen, die Corticosteroide, Androgene, Östrogene und Gestagene, einteilen. Jede dieser Gruppen hat bestimmte Struktureigentümlichkeiten im Molekül.
Corticosteroide besitzen eine Doppelbindung im Ring A, die in Konjugation mit der Bindung des Carbonylsauerstoffatoms in $C_3$ steht, ferner eine Kohlenstoffseitenkette am Ring D ($C_{17}$), die in $C_{20}$ einen Carbonylsauerstoff und in $C_{21}$ eine Hydroxylgruppe trägt. Die Glucocorticoide besitzen mehr Hydroxylgruppen (z.B. in $C_{11}$ und $C_{17}$) als die Mineralocorticoide.
Androgene zeichnen sich durch eine konjugierte Doppelbindung im Ring A und ein Carbonylsauerstoffatom an $C_3$ aus. Das $C_{17}$-Atom trägt nur eine OH-Gruppe. Von den Östrogenen sind die Androgene durch eine Methylgruppe in $C_{10}$ und eine größere Sättigung des Ringes A unterschieden.
Östrogene besitzen einen aromatischen Ring A, der in $C_3$ eine phenolische OH-Gruppe trägt. $C_{17}$ trägt eine OH-Gruppe und $C_{13}$ eine Methylgruppe.
Gestagene beitzen wiederum eine mit der Bindung des Carbonylsauerstoffs an $C_3$ konjugierte Doppelbindung im Ring A, dazu eine Kohlenstoffkette an $C_{17}$, die in $C_{20}$ einen Carbonylsauerstoff trägt, dem aber im Gegensatz zu den Corticosteroiden keine OH-

Gruppe in $C_{21}$ benachbart ist.

Cortison:

Cortison, das 17,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,11,2o-trion mit der Summenformel $C_{21}H_{28}O_5$, ist ein aus der Nebennierenrinde isoliertes Glucocorticoid. Es wird zur substitutiven und pharmakodynamischen Corticosteroidtherapie verwendet. In den im Handel befindlichen Präparaten liegt Cortison als Acetat vor, wobei orale oder intravenöse Anwendung möglich ist.

Prednisolon:

Prednisolon, das 11ß,17,21-Trihydroxy-1,4-pregnadien-3,2o-dion mit der Summenformel $C_{21}H_{28}O_5$, ist ein Cortisonderivat und damit zur Corticosteroidtherapie gut geeignet, wobei die Hauptindikationen Nebennierenrindeninsuffizienz, Hypophysenvorderlappeninsuffizienz, Adrenogenitalsyndrom, akutes rheumatisches Fieber, primär chronische Polyarthritis und andere rheumatische Erkrankungen, Iritis, Kollagenkrankheiten, akute Gichtanfälle, heftige allergische Reaktionen, wie z.B. schweres Asthma bronchiale, insbesondere Status asthmaticus, nichttoxische Agranulozytose, ferner Anaphylaxie und hyperergische Reaktionen im Verlauf von Infektionskrankheiten, nephrotisches Syndrom, lymphatische Leukämie, chronische aggressive Hepatitis und schwere Schockzustände durch Unfall sowie Langzeitbehandlung chronisch obstruktiver Bronchitis sind. Die Substanz kann sowohl intravenös als auch oral je nach Indikation appliziert werden. Bei Dermatosen und entzündlichen sowie allergischen Erkrankungen des äußeren Auges genügt häufig die lokale Anwendung. Prednisolon liegt als Monosubstanz u.a. in den Handelspräparaten Deltacortril$^R$, Hostacortin "H"$^R$ und Ultracorten "H"$^R$ vor.

Spironolacton:

Spironolacton, das 3-(3-oxo-7α-acetylthio-17ß-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-propionsäure-γ-lacton mit der Summenformel $C_{24}H_{32}O_4S$, ist eine synthetische Steroidverbindung, die kompetitiv die Wirkung des Aldosterons, eines Mineralocorticoids, an dessen Erfolgsorgan, dem distalen Nierentubulus, ohne Beeinflussung oder Rückwirkung auf die normale Sekretion der Nebennierensteroide hemmt. Spironolacton führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Natri-

umionen, einer dieser nicht ganz proportionalen Ausscheidung von Chloridionen und einer osmotischen Diurese; zurückgehalten werden Kalium, Wasserstoff- und Ammoniumionen, wobei die Tendenz zu einer hyperchlorämischen Azidose und Hyperkaliämie besteht. Es ist indiziert bei Leberzirrhose mit Aszites, Fällen von kardialem Ödem und beim nephrotischen Syndrom. Spironolacton kann sowohl oral als auch intravenös appliziert werden und wird unter dem Handelsnamen Aldactone$^{R}$ in mehreren Stärken hergestellt.

Testosteron:

Testosteron, ein 17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on mit der Summenformel $C_{19}H_{28}O_2$, ist das von den Leydigschen Zwischenzellen gebildete Hormon des Hodens. Die Produktion wird von dem die interstitiellen Zellen stimulierenden (luteinisierenden) Hormon des Hypophysenvorderlappens angeregt. Testosteron stimuliert die Entwicklung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale. Im weiblichen Organismus kann es eine Virilisierung erzeugen, die mit Persönlichkeitsveränderungen einhergehen kann. Testosteron besitzt einen anabolen Effekt, der sich in einer Vermehrung der Masse der Skeletmuskeln zeigt, die mit einer positiven Bilanz für Stickstoff, Kalium, Calcium, Phosphat, Sulfat und Chlorid einhergeht. Indikationen sind die Substitutionstherapie bei primärem und sekundärem Hypogonadismus, Oligospermie, Fälle von Impotenz und die Behandlung von Mammakarzinomen. Testosteron wird in der Leber inaktiviert; es ist oral unwirksam. Als Monosubstanz ist es in den Präparaten Testosteron Ferring$^{R}$ und Testoviron$^{R}$ T im Handel.

Östriol:

Östriol, ein 1,3,5(1o)-Oestratrien-3,16$\alpha$,17ß-triol mit der Summenformel $C_{18}H_{24}O_3$, ist ein Stoffwechselprodukt des Östradiols und stellt einen Hauptbestandteil des im Harn ausgeschiedenen Follikelhormons dar. Seine östrogene Wirkung ist nur gering. Es hat keine Wirkung auf das Endometrium, aber einen Östradiol-ähnlichen Effekt auf Zervix und Vaginalschleimhaut. Die Indikationen von Östriol sind klimakterische Beschwerden, Kolpitis, Vulvitis und Portioerosionen. Es liegt als Monosubstanz in den Han-

delspräparaten Ovestin$^{R}$ und Hormomed$^{R}$ vor.

Progesteron:

Progesteron, ein 4-Pregnen-3,2o-dion mit der Summenformel $C_{21}H_{3o}O_2$, auch als Corpus-luteum-Hormon bezeichnet, ist das wichtigste natürliche Gestagen. Sein Hauptbildungsort sind die luteinisierten Granulosazellen des Ovars und das Synzytium der Plazenta; weiter fällt es als Zwischenprodukt in der Biosynthese der Nebennierenrindenhormone an. Progesteron erzeugt am Endometrium die Sekretionsphase, nachdem die Proliferationsphase durch ein Östrogen vorbereitet wurde. Gleichzeitig wird die Ruhetemperatur der Frau etwas erhöht. Nach plötzlichem Abfall des Progesteronspiegels im Blut am Ende des normalen Zyklus oder bei einer den Zyklus nachahmenden Behandlung mit Östrogen und Progesteron kommt es zur Abbruchblutung. In der Milchdrüse fördert Progesteron die Ausbildung der Alveolen. Ferner ist es für die Einbettung des Eies notwendig. Nur in den ersten beiden Monaten der Gravidität stammt das für die Erhaltung der Schwangerschaft verantwortliche Progesteron aus dem Corpus luteum, später aus der Plazenta. Progesteron reduziert in hohen Dosen ebenso wie Androgene und Östrogene die Gonadotropinsekretion. Praktisch bedeutungsvoll ist die Hemmung der Ovulation und des Zyklus.
Die Substanz wird nach Gaben per os weitgehend inaktiviert, allerdings ist sie nach perlingualer Zufuhr wirksam; vorzuziehen ist die intramuskuläre Injektion. Indikationen sind dysfunktionelle Blutungen, insbesondere juvenile und präklimakterische Blutungen, Amenorrhoe, Dysmenorrhoe, Oligomenorrhoe, Hypomenorrhoe, Sterilität und Pruritus. Als Monosubstanz liegt Progesteron in den Präparaten Proluton$^{R}$ und Lutocyclin$^{R}$ vor.

5. Versuchsergebnisse
(s.a. Tab. I und die entsprechenden Diagramme)

5.1. Kreuzreagibilität mit Cardenoliden

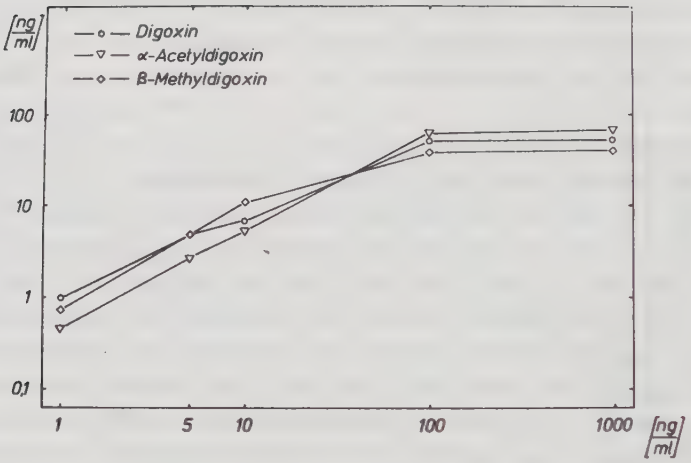



Abb. 4: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit α-Acetyldigoxin und ß-Methyldigoxin im Vergleich zu Digoxin (Abszisse: Vorgabe der Testsubstanzen in ng/ml; Ordinate: Mittelwert der Bestimmungswerte der Testsubstanzen mit dem EMIT-Digoxin-Assay in ng/ml).

Digoxin:

Die Untersuchung von Digoxin ergab im Gültigkeitsbereich des Tests von o,5 - 4,o ng/ml folgende Werte (jeweils ist aufgeführt: Vorgabe der jeweiligen Substanz / Mittelwert der Wiederfindung): 1,o/o,98 ng/ml und 5,o/4,66 ng/ml. Außerhalb dieses Bereiches wurden 1o,o/6,75 ng/ml, 1oo,o/51,71 ng/ml und 1ooo,o/52,44 ng/ml gefunden, wobei die Schwankungsbreite sehr groß war.

α-Acetyldigoxin:

Für α-Acetyldigoxin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 5,o/2,66 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1o,o/5,22 ng/ml, 1oo,o/

63,73 ng/ml und 1ooo,o/68,22 ng/ml mit großer Schwankungsbreite gefunden.

ß-Methyldigoxin:

Für ß-Methyldigoxin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 1,o/o,73 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 5,o/4,93 ng/ml, 1o,o/1o,79 ng/ml, 1oo,o/37,7o ng/ml und 1ooo,o/39,9o ng/ml mit grösserer Schwankungsbreite gefunden.

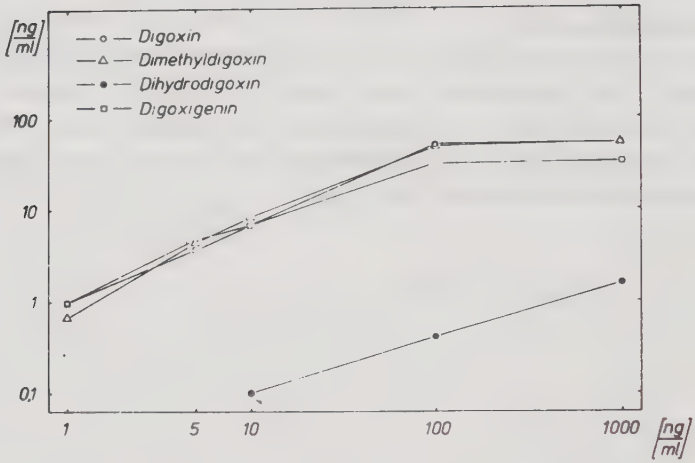



Abb. 5: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Dimethyldigoxin, Dihydrodigoxin und Digoxigenin im Vergleich zu Digoxin.

Dimethyldigoxin:

Für Dimethyldigoxin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 1,o/o,68 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 5,o/4,48 ng/ml, 1o,o/8,47 ng/ml, 1oo,o/49,82 ng/ml und 1ooo,o/52,44 ng/ml mit großer Schwankungsbreite gefunden.

Dihydrodigoxin:

Für Dihydrodigoxin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1ooo,o/1,59 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

Digoxigenin:

Für Digoxigenin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 1,o/o,98 ng/ml und 5,o/3,63 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1o,o/6,34 ng/ml, 1oo,o/31,15 ng/ml und 1ooo,o/33,71 ng/ml mit größerer Schwankungsbreite gefunden.

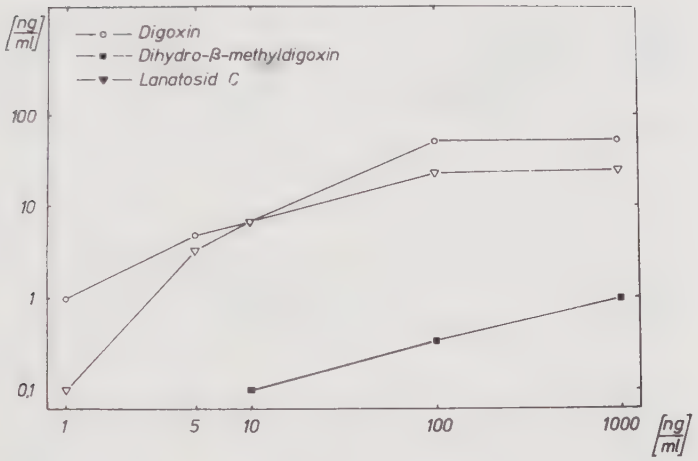



Abb. 6: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Dihydro-ß-methyldigoxin und Lanatosid C im Vergleich zu Digoxin.

Dihydro-ß-methyldigoxin:

Für Dihydro-ß-methyldigoxin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1ooo,o/o,98 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

Lanatosid C:

Für Lanatosid C wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 5,o/3,32 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1o,o/6,85 ng/ml, 1oo,o/22,82 ng/ml und 1ooo,o/24,51 ng/ml mit größerer Schwankungsbreite gefunden.

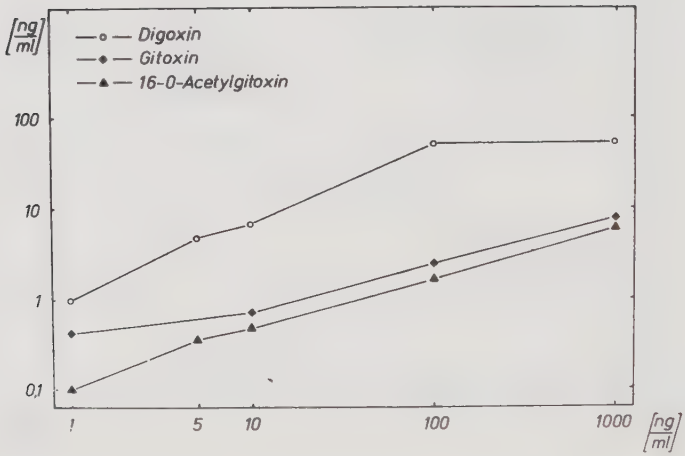



Abb. 7: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Gitoxin und 16-0-Acetylgitoxin im Vergleich zu Digoxin.

Gitoxin:

Für Gitoxin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 5,o/o,62 ng/ml, 1o,o/o,72 ng/ml und 1oo,o/2,51 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1ooo,o/7,84 ng/ml gefunden.

16-0-Acetylgitoxin:

Für 16-0-Acetylgitoxin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen mit Werten von 1oo,o/1,62 ng/ml im linearen Bereich festgestellt; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1ooo,o/6,o3 ng/ml gefunden.

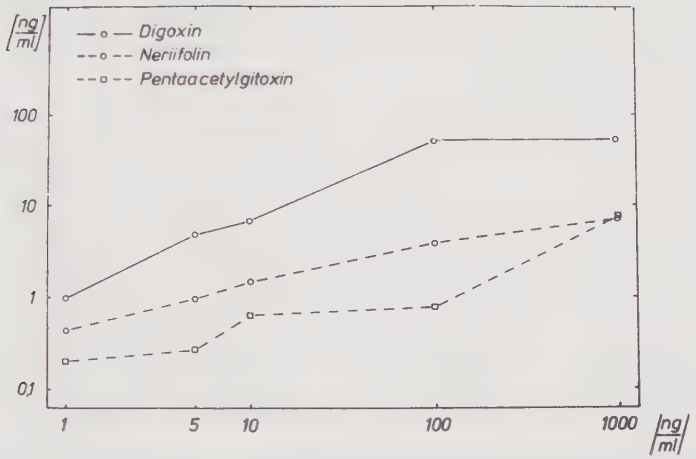



Abb. 8: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Neriifolin und Pentaacetylgitoxin im Vergleich zu Digoxin.

Neriifolin:

Für Neriifolin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 5,o/o,96 ng/ml, 1o,o/1,46 ng/ml und 1oo,o/3,91 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1ooo,o/7,12 ng/ml gefunden.

Pentaacetylgitoxin:

Für Pentaacetylgitoxin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 1o,o/o,64 ng/ml und 1oo,o/o,79 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1ooo,o/7,84 ng/ml gefunden.

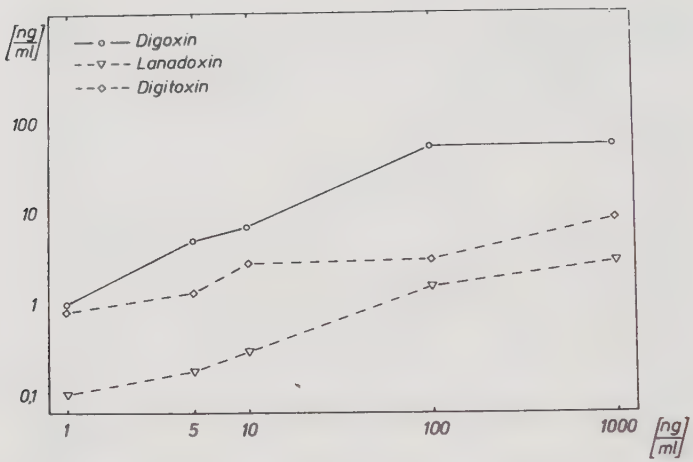



Abb. 9: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Lanadoxin und Digitoxin im Vergleich zu Digoxin.

Lanadoxin:

Für Lanadoxin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1oo,o/ 1,49 ng/ml und 1ooo,o/2,78 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

Digitoxin:

Für Digitoxin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 1,o/o,8o ng/ml, 5,o/1,31 ng/ml, 1o,o/2,7o ng/ml und 1oo,o/2,96 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1ooo,o/8,33 ng/ml gefunden.

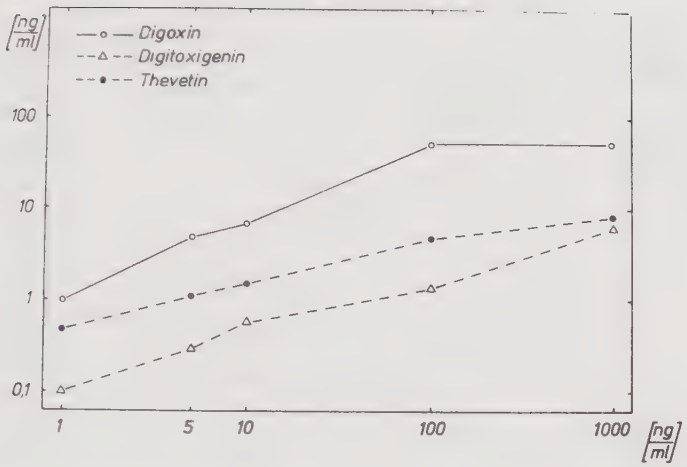



Abb. 1o: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Digitoxigenin und Thevetin im Vergleich zu Digoxin.

Digitoxigenin:

Für Digitoxigenin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 1o,o/o,57 ng/ml und 1oo,o/1,39 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1ooo,o/6,36 ng/ml gefunden.

Thevetin:

Für Thevetin wurde eine positive Kreuzreaktion festgestellt mit Werten von 5,o/1,13 ng/ml und 1o,o/1,49 ng/ml im linearen Bereich; im nichtlinearen Bereich wurden Werte von 1oo,o/4,78 ng/ml und 1ooo,o/8,33 ng/ml gefunden.

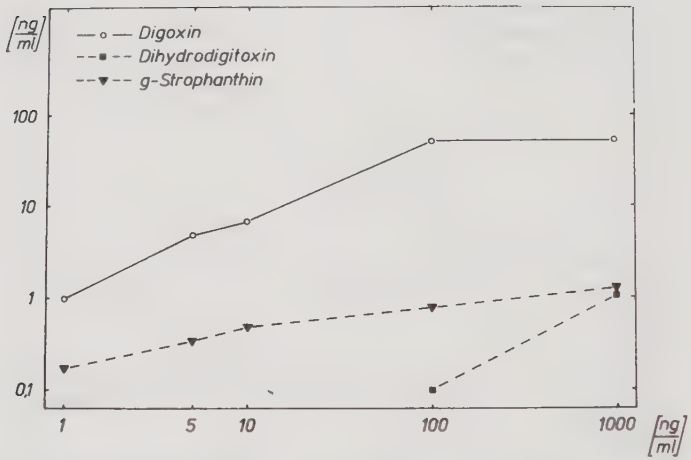



Abb. 11: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Dihydrodigitoxin und g-Strophanthin im Vergleich zu Digoxin.

Dihydrodigitoxin:

Für Dihydrodigitoxin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1ooo,o/1,o4 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

g-Strophanthin:

Für g-Strophanthin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1oo,o/o,77 ng/ml und 1ooo,o/1,26 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

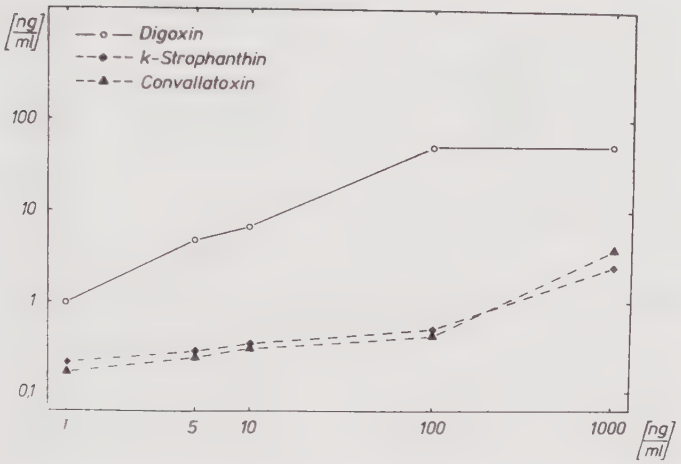



Abb. 12: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit k-Strophanthin und Convallatoxin im Vergleich zu Digoxin.

k-Strophanthin:

Für k-Strophanthin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1oo,o/o,51 ng/ml und 1ooo,o/2,55 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

Convallatoxin:

Für Convallatoxin wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1ooo,o/3,84 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

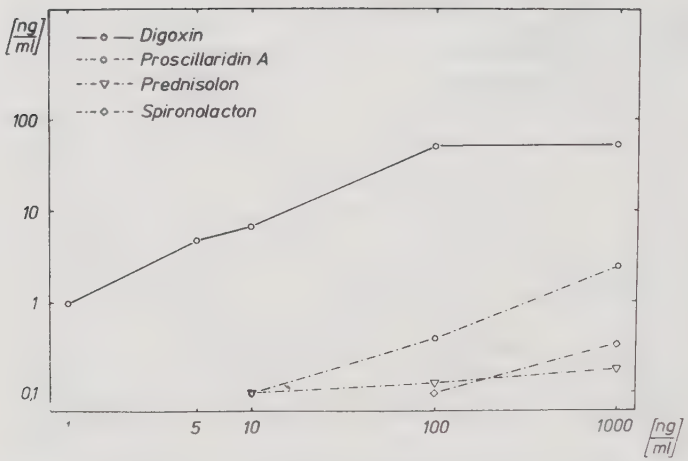



Abb. 13: Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit Proscillaridin A, Prednisolon und Spironolacton im Vergleich zu Digoxin.

5.2. Kreuzreagibilität mit Bufadienoliden

Proscillaridin A:

Für Proscillaridin A wurde eine positive Kreuzreaktion erst bei höheren Konzentrationen festgestellt, und zwar wurden Werte von 1ooo,o/2,59 ng/ml im linearen Bereich gefunden.

5.3. Kreuzreagibilität mit Steroidhormonen

Prednisolon:

Bei Prednisolon wurde bei allen getesteten Konzentrationen keine Kreuzreaktion festgestellt.

Spironolacton:

Bei Spironolacton wurde bei allen getesteten Konzentrationen keine Kreuzreaktion festgestellt.

Cortison:

Bei Cortison wurde bei allen getesteten Konzentrationen keine Kreuzreaktion festgestellt.

Testosteron:

Bei Testosteron wurde bei allen getesteten Konzentrationen keine Kreuzreaktion festgestellt.

Östriol:

Bei Östriol wurde bei allen getesteten Konzentrationen keine Kreuzreaktion festgestellt.

Progesteron:

Bei Progesteron wurde bei allen getesteten Konzentrationen keine Kreuzreaktion festgestellt.

Für folgende Substanzen gibt die Herstellerfirma Syva, USA, ebenfalls keine signifikanten Kreuzreaktionen an:

Barbiturate
Chinidin
Cholesterin
Cortisol
Diphenylhydantoin
Furosemid
Hydrochlorothiazid
Lidocain
Procainamid
Propanolol

5.4. Interferenzen von pathologischen Seren (s.a. Tab. II)

Hämolytisches Serum:

Die Untersuchung von hämolytischem Serum konnte nicht durchgeführt werden, da wegen der hohen Farbkonzentration des Hämoglobins keine Extinktionsmessung möglich war.

Ikterisches Serum:

Die Untersuchung von ikterischem Serum ergab für die Proben ohne Digoxinvorgabe eine korrekte Nullanzeige. Bei Vorgabe eine Digoxinkonzentration von 1,25 ng/ml wurden im Mittel 1,3o ng/ml bestimmt; dabei war in einzelnen Fällen die Reproduzierbarkeit nicht immer gegeben.

Lipämisches Serum:

Die Untersuchung von lipämischem Serum konnte nicht durchgeführt

werden, da wegen der hohen Trübung durch Triglyceride keine Extinktionsmessung möglich war.

Urämisches Serum:

Die Untersuchung von urämischem Serum ergab für die Proben ohne Digoxinvorgabe eine korrekte Nullanzeige. Bei Vorgabe einer Digoxinkonzentration von 1,25 ng/ml wurden im Mittel o,47 ng/ml bestimmt; dabei war in einzelnen Fällen die Reproduzierbarkeit nicht immer gegeben.

## 6. Diskussion

Der homogene EMIT-Digoxin-Assay benötigt als Methode ohne Serumextraktion und ohne Separationsschritte nur einen relativ geringen zeitlichen Aufwand. Allerdings ist für eine gute Reproduzierbarkeit sehr exaktes Arbeiten notwendig, besonders die zeitlichen Abstände bei den Extinktionsmessungen müssen genau beachtet werden. Solange die Enzymaktivitätsbestimmung manuell erfolgt, sind Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays schlechter als die des Radioimmunoassays, wobei zu diesem bemerkt werden muß, daß es beim Radioimmunoassay ebenfalls keine Strahlenbelastung sowohl für die Patienten als auch bei sorgfältigem Arbeiten für das Laborpersonal gibt. Die apparative Ausrüstung zur Durchführung des EMIT-Digoxin-Assays dürfte in jedem klinischen oder zentralen Labor vorhanden sein, sodaß seiner routinemäßigen Anwendung von der technischen Seite her keine größeren Schwierigkeiten entgegenstehen dürften. Der Empfindlichkeitsbereich des Tests zwischen 0,5 und 4,0 ng/ml genügt den klinischen Ansprüchen. Bei der Untersuchung auf Kreuzreagibilität mit verschiedenen dem Digoxin in der Struktur ähnlichen Substanzen wurden in unterschiedlichem Maß positive Kreuzreaktionen nur bei Cardenoliden, ihren Metaboliten oder halbsynthetischen Verbindungen und bei Bufadienoliden festgestellt. Die Spezifität des Tests ist somit gegenüber verschiedenen natürlichen wie halbsynthetischen Herzglykosiden und einigen ihrer Stoffwechselprodukte weniger ausgeprägt als gegenüber anderen Verbindungen mit Steroidstruktur. Ein großer Nachteil liegt allerdings in den Interferenzen von pathologischen, wie hämolytischen, ikterischen, lipämischen und urämischen Seren. Gerade in diesen Fällen ist es oft außerordentlich wichtig, eine exakte Digoxinbestimmung durchzuführen, sodaß hier nach dem heutigen Stand des EMIT-Digoxin-Assays auf andere Bestimmungsmethoden ausgewichen werden muß.

## 7. Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen galten insbesondere der qualitativen Kreuzreagibilität und den Interferenzen von pathologischen Seren bei der Anwendung des homogenen Enzymimmunoassays der Firma Syva, USA, dem EMIT-Digoxin-Assay. Im einzelnen konnten folgende Feststellungen getroffen werden:

1. Positive Kreuzreaktionen in unterschiedlichem Ausmaß waren bei folgenden untersuchten Substanzen vorhanden:
   Digoxigenin, α-Acetyldigoxin, ß-Methyldigoxin, Dimethyldigoxin, Dihydrodigoxin, Dihydro-ß-methyldigoxin, Lanatosid C;
   Gitoxin, 16-O-Acetylgitoxin, Neriifolin, Pentaacetylgitoxin, Lanadoxin;
   Digitoxin, Digitoxigenin, Thevetin, Dihydrodigitoxin;
   g-Strophanthin, k-Strophanthin;
   Convallatoxin;
   Proscillaridin.

2. Die Kreuzreaktionen fielen negativ aus bei folgenden Substanzen:
   Cortison, Prednisolon;
   Spironolacton;
   Testosteron;
   Östriol;
   Progesteron.

   Die Spezifität des Tests ist gegenüber natürlichen wie halbsynthetischen Herzglykosiden und einigen ihrer Metabolite weniger ausgeprägt als gegenüber anderen Substanzen mit Steroidstruktur.

3. Die Untersuchung pathologischer Seren ergab für ikterische Seren eine mangelhafte Reproduzierbarkeit und für urämische Seren einen ungefähr um 60 % zu niedrigen Bestimmungswert, verbunden mit einer verringerten Reproduzierbarkeit. Die Untersuchung hämolytischer und lipämischer Seren konnte nicht durchgeführt werden, da die Extinktionsmessung wegen zu hoher Farbkonzentration bzw. zu hoher Trübung nicht möglich war. Für die Untersuchung solcher Seren muß deshalb eine andere

Bestimmungsmethode (z.B. der Radioimmunoassay) empfohlen werden.

8. Literaturverzeichnis

1. BACH, E.J., REITER, M.: The difference in velocity between lethal and ionotropic action of dihydrodigoxin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 248, 437 (1964)

2. BASTIANI, R.J., PHILLIPS, R.C., SCHNEIDER, R.S., ULLMAN, E.F.: Homogeneous Immunochemical Drug Assay. Am. J. Med. Tech., 39, 211 - 216, (1973)

3. BAUMGARTEN, G.: Die herzwirksamen Glykoside. Thieme-Verlag Leipzig (1963)

4. BELLER, G.A., SMITH, T.W., ABELMANN, W.H., HABER, E., HOOD, W.B.: Digitalis intoxication: A prospective clinical study with serum level determinations. New Engl. J. of Med. 284, 989 (1971)

5. BELZ, G.G., VOLLMER, K.O., WISSLER, J.H.: Zur Hemmwirkung von Herzglykosiden auf die $^{86}$Rb-Aufnahme der Erythrozyten. I. Methodische Untersuchungen zur Konzentrationsbestimmung von Agmarin und Digitoxin. Europ. J. Clin. Pharmacol. 4, 92 (1972)

6. BELZ, G.G.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 46. Herausgeber: H. Jahrmärker. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1975)

7. BENTLEY, J.D., BURNETT, G.H., CONKLIN, R.L., WASSERBURGER, R.H.: Clinical application of serum digoxin levels: A simplified plasma determination. Circulation 41, 67 (197o)

8. BERTLER, A., REDFORS, A.: An improved method of estimating digoxin in human plasma. Clin. Pharmacol. Ther. 11, 665 (197o)

9. BERTLER, A., REDFORS, A.: The $^{86}$Rb method for digoxin assay. Comparison with radioimmunoassay. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo (1973)

1o. BINNION, P.F., MORGAN, L.M., STEVENSON, H.M., FLETCHER, E.: Plasma and myocardial digoxin concentrations in patients on oral therapy. Brit. Heart J. 31, 636 (1969)

11. BINNION, P.F.: Plasma digoxin levels and electrocardiographic changes in man. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo (1973)

12. BLOOM, P.M., NELP, W.B.: Relationship of the excretion of tritiated digoxin to renal function. Amer. J. Med. Sci. 251, 133 (1966)

13. BODEM, G., GILFRICH, H.J.: Methoden zur Bestimmung von Digoxin und Digitoxin im Blut und ihre klinische Bedeutung. Klin. Wschr. 51, 57 (1973)

14. BRANDT, R., STÖCKLIN, W., REICHSTEIN, T.: Alloglaucotoxigenin, Strukturbestimmung. Helv. Chim. Acta 49, 1662 (1966)

15. BROOKER, G., JELLIFFE, R.W.: Determination of serum digoxin by enzymatic isotopic displacement of $^{3}$H-digoxin from $Na^{+}$-$K^{+}$-ATPase. Fed. Proc. 28, 6o8 (1969)

16. BROOKER, G., JELLIFFE, R.W.: Serum cardial glycoside assay based upon displacement of $^{3}$H-ouabain from $Na^{+}$-$K^{+}$-ATPase. Circulation 45, 2o (1972)

17. BROWN, B.T., STAFFORD, A., WRIGHT, S.E.: Chemical structure and pharmacological activity of some derivates of digitoxigenin and digoxigenin. Brit. J. Pharmacol. 18, 311 (1962)

18. BURNETT, G.H., CONKLIN, R.L.: The enzymatic assay of plasma digoxin levels. J. Lab. Clin. Med. 71, 1o4o (1968)

19. BUTLER, V.P.: Assays of digitalis in blood. Progr. Cardiovasc. Dis. 14, 571 (1972)

2o. CHAMBERLAIN, D.A., WHITE, R.J., HOWARD, M.R., SMITH, T.W.: Plasma digoxin concentration in patients with atrial fibrillation. Brit. Med. J. 3, 429 (197o)

21. CHEN, K.K., ELDERFIELD, K.C.: Cardiac action of derivates of Strophanthidin and Cymarin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 7o, 338 (194o)

22. CHEN, K.K., HENDERSON, F.G.: Pharmacology of sixty-four cardiac glycosides and aglycones. J. Pharm. Exp. Ther. 111, 365 (1954)

23. CHUNG, E.K., THOMAS, J.: Arrhythmias caused by digitalis toxicity. Genetics 2o, 1oo6 (1965)

24. CHUNG, E.K.: The current status of digitalis therapy. Modern Treatment 8, 643 (1971)

25. CURD, J., SMITH, T.W., JATON, J.C., HABER, E.: The isolation of digoxin-specific antibody and its use in reversing the effects of digoxin. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 24o1 (1971)

26. DANIELI, N., MAZUR, Y., SONDHEIMER, F.: The sythesis of digitoxigenin. Tetrahedron 22, 3189 (1966)

27. DENGLER, H.J., BODEM, G., WIRTH, K.: Pharmakokinetische Untersuchungen mit dem $^{3}$H-Digoxin und $^{3}$H-Lanatosid C beim Menschen. Arzneimittel-Forsch. 23, 64 (1973)

28. DREWES, P.A., PILEGGI, V.J.: Faster and easier radioimmunoassay of digoxin. Clin. Chem. 2o, 343 (1974)

29. ELDERFIELD, R.C.: Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe. Festschrift A. Stoll 1947. In: Lettré, Inhoffen, Tschesche, 2. Aufl., 42o (Stuttgart 1954)

3o. ERDMANN, E.: Bestimmung der Herzglykosidkonzentration im Serum. Internist 16, 185 (1975)

31. ERLANGER, B.F., BEISER, S.M.: Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. Proc. Acad. Sci. USA 52, 68 (1964)

32. EVERED, D.C., CHAPMAN, C.: Plasma digoxin concentration and digoxin toxicity in hospital patients. Brit. Heart J. 33, 54o (1971)

33. EWY, E.A., KAPADIA, G.G., YAO, L., LULLIN, M., MARCUS, F.T.: Digoxin metabolism in the elderly. Circulation 39, 449 (1969)

34. FOGELMAN, A.M., LAMONT, J.T., FINKELSTEIN, S., RADO, E., PEARSE, M.L.: Fallibility of plasma-digoxin in differentiating toxic from nontoxic patients. Lancet II, 727 (1971)

35. GEILING, E.M.K., McINTOSH, B.J.: Biosynthesis of radioac-

tive drugs using carbon-14. Science 1o8, 558 (1948)

36. GEILING, E.M.K.: Biosynthesis and pharmacology of radioactive digitalis and other medicinally important drugs. Med. Ann. D. C. 2o, 197 (1951)

37. GILFRICH, H.J., SCHÖLMERICH, P.: Digitalisintoxikation. Neue Gesichtspunkte zur Entstehung und Bewertung. DMW 1oo, 831 (1975)

38. GJERDRUM, K.: Determination of digitalis in blood. Acta Med. Scand. Vol. 187, 371 (197o)

39. GOLDFINGER, S., HEIZER, W.D., SMITH, T.W.: Malabsorption of digoxin in malabsorption syndromes. Gastroenterology 58, 952 (197o)

4o. GRAHAME-SMITH, D.G., EVEREST, M.S.: Measurement of digoxin in plasma and its use in diagnosis of digoxin intoxication. Brit. Med. J. 1, 286 (1969)

41. GREEFF, K.: Zur Pharmakologie der herzwirksamen Glykoside. Die Wirkung der Glykoside auf den Stoffwechsel des Herzmuskels. Klin. Physiol. 1, 34o (1963)

42. GREEFF, K.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 47. Herausgeber: H. Jahrmärker. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1975)

43. GROSSE-BROCKHOFF, F.: Herz- und Gefäßkrankheiten. In: H. Dennig, Lehrbuch der Inneren Medizin, Stuttgart (1957)

44. GROSSE-BROCKHOFF, F., HENGELS, K.J., FRITSCH, W.-P., GRABENSEE, B., HAUSAMEN, T.U.: Serumdigoxinspiegel und Nierenfunktion. DMW 98, 1547 (1973)

45. HABERLAND, G., MAERTEN, G.: Spezifischer Deuterium- und Tritium-Austausch in Cardenoliden und Cardenolidglykosiden. Naturwiss. 56, 516 (1969)

46. HABERLAND, G.: Herstellung und Einsatz radioaktiver Glykoside. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R. Schröder und K. Greeff. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1972)

47. HABERLAND, G.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 46 ff. Herausgeber: H. Jahrmärker. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1975)

48. HEIZER, W.D., SMITH, T.W., GOLDFINGER, S.: Absorption of digoxin in patients with malabsorption syndromes. New Engl. J. Med. 285, 257 (1971)

49. HENDERSON, F.G., CHEN, K.K.: Cardiac activity of newer digitalis glycosides and aglycones. J. Med. Clin. 5, 988 (1962)

5o. HENDERSON, F.G., CHEN, K.K.: Cardiac glycosides and aglycones by synthesis and microbiological conversion. J. Med. Chem. 8, 577 (1965)

51. HOESCHEN, R.J., PROVEDA, V.: Serum digoxin by radioimmunoassay. Can. Med. Assoc. J. 1o5, 17o (1971)

52. HOLTZMAN, J.L., SHAFER, R.B., ERICKSON, R.R.: Methodological causes of discrepancies in radioimmunoassay for digoxin in human serum. Clin. Chem. 2o, 1194 (1974)

53. JELLIFFE, R.W., BLANKENHORN, D.H.: Gas chromatography of digitoxigenin and digoxigenin. J. Chromatogr. 12, 268 (1963)

54. JUHASZ, G., TAMM, Ch.: Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen. Helv. Chim. Acta 44, 1o63 (1961)

55. KOCH-WESER, J.D., DÜHME, W., GREENBLATT, D.J.: Influence of serum digoxin concentration measurements on digitoxicity. Clin. Pharmacol. Ther. 16, 284 (1974)

56. KOVARIKOVA, A., KOLAROWY, H., PITRA, J.: Einfluß der 16-Hydroxyl-Gruppe auf die Aktivität der Cardenolide. Die inotrope Aktivität des 16-epi-Gitoxigenin. Experimenta 2o, 263 (1964)

57. KRAMER, P., SCHELER, F.: Eliminationskinetische Kriterien für die Auswahl von Herzglykosiden bei Niereninsuffizienz. In: Medikamentöse Therapie bei Nierenerkrankungen. Herausgeber: R. Kluthe, Thieme-Verlag Stuttgart (1971)

58. KRAMER, P., SAUL, J., KÖTHE, E., SCHELER, F.: Vereinfachte

Schnellbestimmung von Plasma-Digoxin. Methodik und klinische Erfahrung. Klin. Wschr. 53, 215 (1975)

59. KÜMMERLE, H.P., GARRETT, E.R., SPITZY, K.H.: Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie. Urban & Schwarzenberg (2. Auflage), Berlin-München-Wien (1973)

60. KUSCHINSKY, G.: Digitalistherapie in der Praxis. DÄ 71, 615 (1974)

61. LADER, S., BYE, A., MARDSEN, P.: The measurement of plasma digoxin concentration: A comparison of two methods. Europ. J. Clin. Pharmacol. 5, 22 (1972)

62. LADER, S., JOHNSON, B.: Interpretation of results obtained using digoxin radioimmunoassay. Postgrad. Med. J. 50, 18 (1974)

63. LAHRTZ, H., REINOLD, H.M., VAN ZWIETEN, P.A.: Serum concentration and urinary excretion of $^{3}H$-ouabain in patients suffering from liver or kidney diseases. Pharmacol. Clin. 1, 114 (1969)

64. LARBIG, D., KOCHSIEK, K.: Zur radioimmunologischen Bestimmung von Digoxin und Digoxinderivaten. DMW 97, 1310 (1972)

65. LARBIG, D., KOCHSIEK, K., SCHRADER, Ch.: Klinische Aspekte der radioimmunochemischen Bestimmung der Serum-Digoxin-Konzentration. DMW 97, 1389 (1972)

66. LINDENBAUM, J., MAULITZ, K.M., SAHA, J.R., SHEA, N., BUTLER, V.P.: Impairment of digoxin absorption by neomycin. Clin. Res. 20, 410 (1972)

67. LOVE, W.D., BURCH, G.E.: A comparison of potassium$^{42}$, rubidium$^{86}$ and caesium$^{134}$ as tracers of potassium in the study of cation metabolism of human erythrocytes in vitro. J. Lab. Clin. Med. 41, 351 (1953)

68. LOWENSTEIN, J.M.: A method for measuring plasma levels of digitalis glycosides. Circulation 31, 228 (1965)

69. LOWENSTEIN, J.M., CORRIL, E.M.: An improved method for measuring plasma and tissue concentrations of digitalis glyco-

sides. J. Lab. Clin. Med. 67, 1048 (1966)

70. LUKAS, D.S., PETERSON, R.E.: Determination of digitoxin in plasma by double isotope dilution derivate assay. J. Clin. Invest. 43, 1242 (1964)

71. LUKAS, D.S., PETERSON, R.E.: Double isotope dilution derivate assay of digitoxin in plasma, urine and stool of patients maintained on the drug. J. Clin. Invest. 45, 782 (1966)

72. LUKAS, D.S.: The pharmakokinetics and metabolism of digitoxin in man. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo (1973)

73. MEDZIHRADSKY, F., NANDHASRI, P.S., KHANNA, U.: Enzymatic determination of cardiac glycosides. Biochem. Med. 5, 285 (1971)

74. MEGGES, R., REPKE, K.: Über Faktoren, welche die orale Wirksamkeit von Herzglykosiden bestimmen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmakol. 241, 534 (1961)

75. MEGGES, R., REPKE, K.: Improved intestinal absorption of polar glycosides by acylation. Proc. 1st International Pharmacological Meeting, Vol. 3, Pergamon Press, Oxford (1963)

76. MUELLER, H., GRAUL, E.H.: Diagnostik mit Radioimmunoassays. DÄ 71, 854 (1974)

77. MUELLER, H.: Unveröffentlichte Beobachtung

78. MUELLER, H., JOST, F., GRAUL, E.H., RIDDER, H.W., BRAEUER, H., CHRIST, K.: Digoxin-RIA mit immobilisiertem Antikörper - Vergleich mit einer Charcoal-Methode. Nuc. Compact. Im Druck

79. OLIVER, G.C., PARKER, B.M., BRASFIELD, D.L.: The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. J. Clin. Invest. 47, 1035 (1968)

80. OLIVER, G.C., PARKER, B.M., PARKER, C.W.: Radioimmunoassay for digoxin. Technic and clinical application. Amer. J.

Med. 51, 186 (1971)

81. PETERS, U., HAUSAMEN, T.V., GROSSE-BROCKHOFF, F.: Einfluß von Tuberkulostatika auf die Pharmakokinetik des Digitoxins. DMW 99, 2381 (1974)

82. PHILIPPS, A.P.: The improvement of specificity in radioimmunoassays. Clin. Acta 44, 333 (1973)

83. RASMUSSEN, K., JERWELL, J., STORSTEIN, L., GJERDRUM, K.: Digitoxin kinetics in patients with impaired renal function. Clin. Pharmacol. Ther. 13, 6 (1972)

84. REPKE, K.: Glykosidspaltungen im Tierkörper. Naturwiss. 46, 173 (1959)

85. REPKE, K.: Metabolism of cardiac glycosides. In: New aspects of cardiac glycosides. Editors: W. Wilbrandt and P. Lindgren. N. Y., Macmillan (1963)

86. REPKE, K.: Biochemie und Klinik des Digitalis. Internist 7, Heft 8 (1966)

87. REPKE, K.: Biochemische Grundlagen der Entwicklung neuartiger Herzmittel des Digitalistyps. Pharmacie 27, 11 (1972)

88. RISLER, T., GRABENSEE, B., GROSSE-BROCKHOFF, F.: EKG-Veränderungen und Digoxin-Serum-Konzentration bei Digitalisintoxikationen. DMW 1oo, 821 (1975)

89. ROTLIN, E., BIRCHER, R.: Pharmakodynamische Grundlagen der Therapie mit herzwirksamen Glykosiden. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 5, 457 (1954)

9o. RUBENSTEIN, K.E., SCHNEIDER, R.S., ULLMAN, E.F.: Homogeneous enzyme immunoassay, a new immunochemical technique. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 47, 846 - 851 (1972)

91. RUIZ-TORRES, A.: Kinetik der Herzsteroide im Organismus des Menschen und der Versuchstiere. Klin. Wschr. 48, 257 (197o)

92. SCHATZMANN, H.J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran. Helv. Physiol. Acta 11, 346 (1953)

93. SCHNEIDER, R.S., LINDQUIST, P., TONG-IN WONG, E., RUBEN-

STEIN, K.E., ULLMAN, E.F.: Homogeneous enzyme immunoassay for opiates in urine. Clin. Chem. 19, 821 - 825 (1973)

94. SCHWIEGK, H., JAHRMÄRKER, H.: Therapie der Herzinsuffizienz. In: Handbuch der Inneren Medizin 9/1, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960)

95. SMITH, T.W., BUTLER, V.P., HABER, E.: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay. New Engl. J. Med. 281, 1212 (1969)

96. SMITH, T.W., BUTLER, V.P., HABER, E.: Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside. Biochemistry 9, 331 (1970)

97. SODEMAN, W.A.: Diagnosis and treatment of digitalis toxicity. New Engl. J. Med. 273, 35 and 93 (1965)

98. TAMM, C., GUBLER, A.: Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen. II. Umsetzung von Aglykonen und Glykosiden mit Fusarium lini (Bolley). Helv. Chim. Acta 42, 239 (1959)

99. TAMM, C.: The stereochemistry of the glycosides in relation to biological activity. First International Pharmacol. Meeting 3, 11 (1961)

100. TAN, L.: An improved method for the gas chromatographic identification of digitalis cardenolides. J. Chromatogr. 45, 68 (1969)

101. VICK, R.L., KAHN, J.B., ACHESON, G.H.: Effects of dihydroouabain, dihydro-digoxin and dihydro-digitoxin on the heart-lung preparation of the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 121, 330 (1957)

102. WARREN, M.C., GIANELLY, R.E., CUTLER, S.L., HARRISON, D.C.: Digitalis toxicity II. The effect of metabolic alkalosis. Am. Heart J. 75, 358 (1968)

103. WARTBURG VON, A.V., KALBERER, F., RUTSCHMANN, J.: Tritium-labeled cardiac glycosides: Digoxin (12 - $^{3}H$). Biochem. Pharmacol. 14, 1883 (1965)

1o4. WASER, P.G.: Über den Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden. Schweiz. Med. Wschr. 92, 819 (1962)

1o5. WATSON, E., KALMAN, S.M.: Assay of digoxin in plasma by gas chromatography. J. Chromatogr. 56, 2o9 (1971)

1o6. WATSON, E., TRAMELL, P., KALMAN, S.M.: Identification of submicrogram amounts of digoxin, digitoxin and their metabolic products. J. Chromatogr. 69, 157 (1972)

1o7. WATSON, E., CLARK, D.R., KALMAN, S.M.: Identification by gas chromatography mass spectroscopy of dihydrodigoxin - a metabolite of digoxin in man. J. Pharmacol. Exp. Ther. 184/2, 424 (1973)

1o8. WILZBACH, K.E.: Tritiumlabeling by exposure of organic compounds of tritiumgas. J. Amer. Chem. Soc. 79, 1o13 (1957)

1o9. WIRTH, K., BODEM, G., DENGLER, H.J.: Resorption, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digoxin und digoxinverwandten Verbindungen. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R. Schröder und K. Greeff. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1972)

11o. WRIGHT, S.E.: The metabolism of cardiac glycosides. Charles C. Thomas, Springfield/III (196o)

111. YALOW, R.S., BERSON, S.A.: Immunoassay of plasma insulin. Meth. Biochem. Qual. 12, 69 (1964)

112. YODA, A.: Structure-activity relationship of cardiotonic steroids for the inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosinetriphosphatase. 1. Dissociation rate constants of various enzyme-cardiac glycoside complexe formed in the presence of magnesium and phosphate. Molec. Pharmacol. 9, 51 (1973)

113. ZORBACH, W., PIETSCH, G.: Teilsynthese der anomeren 2-Desoxy-Glycopyranoside des Digoxigenins. Ann. 655, 25 (1962)

114. ZORBACH, W., SAEKI, S., BÜHLER, W.: Strophanthidin cardenolides containing hexoses of the mannose series. J. Med. Chem. 6, 298 (1963)

9. Anhang

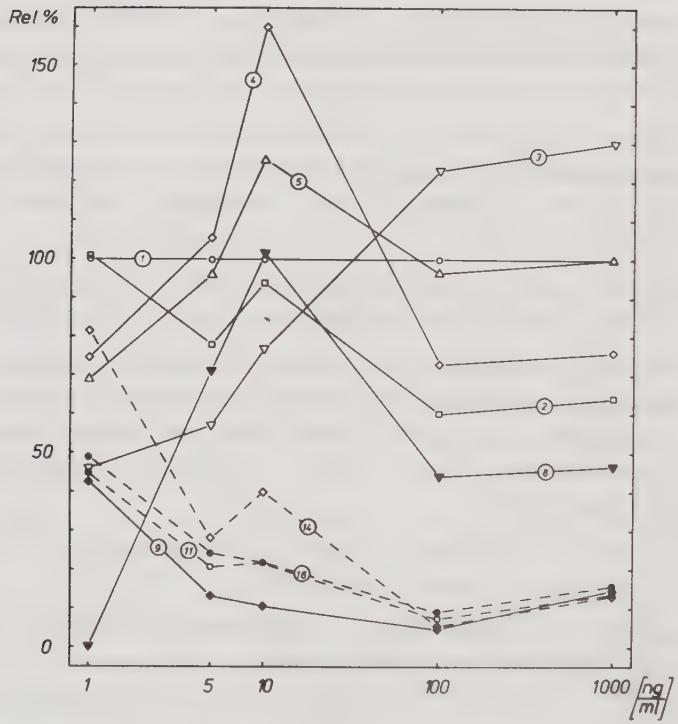



Abb. 14a

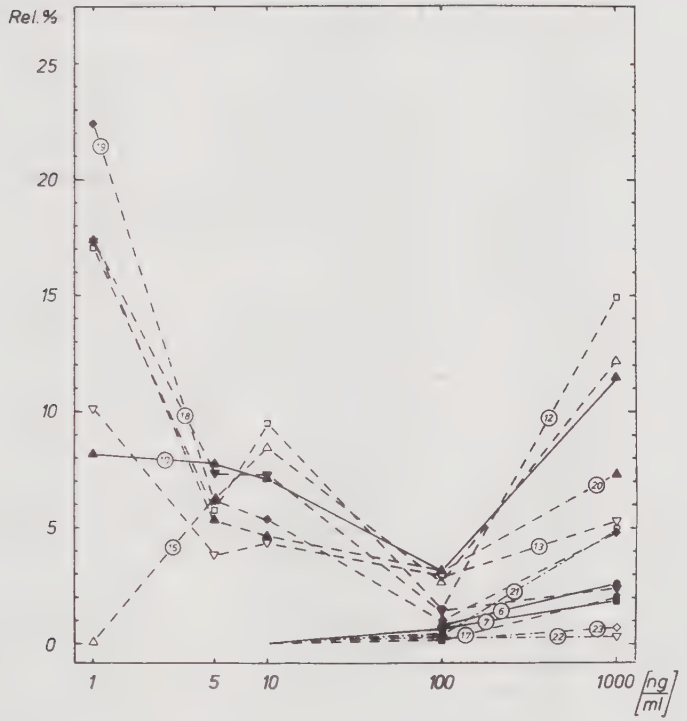
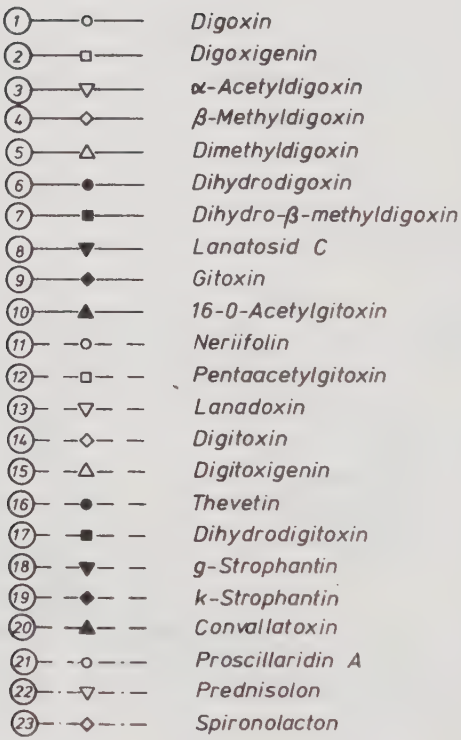



Abb. 14b




**Zeichenerklärung zu den Abb. 14a und 14b**

**Abb. 14a u. b: Zusammenfassende Darstellung der Prüfung auf falsch positive Bestimmungsergebnisse (Kreuzreaktionen) mit den getesteten Substanzen im Vergleich zu Digoxin (Abszisse: Vorgabe der Substanzen in ng/ml; Ordinate: Mittelwert der Bestimmungswerte der Testsubstanzen mit dem EMIT-Digoxin-Assay in % zu den im Mittel von Digoxin bestimmten Werten).**

| Vorgabe | 1,o | | | 5,o | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Substanz | Min. | ø | Max. | Min. | ø | Max. |
| Digoxin | o,9o | o,98 | 1,o9 | 4,46 | 4,66 | 5,33 |
| Digoxigenin | o,86 | o,99 | 1,o4 | 3,46 | 3,63 | 4,oo |
| α-Acetyldigoxin | o,29 | o,45 | o,59 | 2,2o | 2,66 | 2,96 |
| ß-Methyldigoxin | o,55 | o,73 | o,88 | 4,55 | 4,93 | 5,27 |
| Dimethyldigoxin | o,63 | o,68 | o,7o | 3,87 | 4,48 | 4,93 |
| Dihydrodigoxin | o,oo | o,oo | o,18 | o,oo | o,oo | o,oo |
| Dihydro-ß-methyldigoxin | o,oo | o,oo | o,o7 | o,oo | o,oo | o,oo |
| Lanatosid C | o,oo | o,oo | o,oo | 3,1o | 3,32 | 3,62 |
| Gitoxin | o,32 | o,42 | o,53 | o,53 | o,62 | o,72 |
| 16-O-Acetylgitoxin | o,oo | o,o8 | o,27 | o,12 | o,36 | o,51 |
| Neriifolin | o,34 | o,44 | o,55 | o,78 | o,96 | 1,14 |
| Pentaacetylgitoxin | o,o2 | o,2o | o,4o | o,17 | o,27 | o,36 |
| Lanadoxin | o,oo | o,1o | o,18 | o,oo | o,18 | o,29 |
| Digitoxin | o,57 | o,8o | o,93 | 1,o9 | 1,31 | 1,52 |
| Digitoxigenin | o,oo | o,oo | o,oo | o,o5 | o,29 | o,41 |
| Thevetin | o,34 | o,48 | o,7o | 1,1o | 1,13 | 1,19 |
| Dihydrodigitoxin | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| g-Strophanthin | o,o2 | o,17 | o,29 | o,2o | o,34 | o,42 |
| k-Strophanthin | o,o3 | o,22 | o,34 | o,2o | o,29 | o,4o |
| Convallatoxin | o,15 | o,17 | o,22 | o,12 | o,25 | o,38 |
| Proscillaridin A | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| Cortison | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| Prednisolon | o,oo | o,oo | o,o3 | o,oo | o,oo | o,oo |
| Spironolacton | o,oo | o,oo | o,o4 | o,oo | o,oo | o,1o |
| Testosteron | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| Östriol | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| Progesteron | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |

Alle Zahlenwerte tragen die Benennung ng/ml
Min. ≙ geringste gefundene Konzentration
ø ≙ durchschnittlich gefundene Konzentration
Max. ≙ höchste gefundene Konzentration

Tab. I: "Digoxin"-Bestimmungen nach Vorgabe bestimmter Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen

| Vorgabe | 1o,o | | | 1oo,o | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Substanz | Min. | ø | Max. | Min. | ø | Max. |
| Digoxin | 6,33 | 6,75 | 7,46 | 37,67 | 51,71 | 13o,1o |
| Digoxigenin | 5,73 | 6,34 | 7,17 | 25,o9 | 31,15 | 38,39 |
| ∝-Acetyldigoxin | 4,44 | 5,22 | 5,78 | 38,99 | 63,47 | 85,64 |
| ß-Methyldigoxin | 9,52 | 1o,79 | 11,53 | 27,23 | 37,7o | 46,38 |
| Dimethyldigoxin | 7,43 | 8,47 | 9,33 | 34,41 | 49,82 | 79,o2 |
| Dihydrodigoxin | o,oo | o,oo | o,oo | o,23 | o,41 | o,59 |
| Dihydro-ß-methyldigoxin | o,oo | o,oo | o,oo | o,15 | o,34 | o,42 |
| Lanatosid C | 6,21 | 6,85 | 7,58 | 18,22 | 22,82 | 37,52 |
| Gitoxin | o,59 | o,72 | o,88 | 2,3o | 2,51 | 2,6o |
| 16-O-Acetylgitoxin | o,34 | o,48 | o,59 | 1,36 | 1,62 | 1,82 |
| Neriifolin | 1,36 | 1,46 | 1,68 | 3,65 | 3,91 | 4,25 |
| Pentaacetylgitoxin | o,48 | o,64 | o,74 | o,68 | o,79 | o,9o |
| Lanadoxin | o,18 | o,29 | o,58 | 1,3o | 1,49 | 1,68 |
| Digitoxin | 2,39 | 2,7o | 3,14 | 2,78 | 2,96 | 3,14 |
| Digitoxigenin | o,43 | o,57 | o,68 | 1,11 | 1,39 | 1,62 |
| Thevetin | 1,39 | 1,49 | 1,68 | 4,55 | 4,78 | 4,93 |
| Dihydrodigitoxin | o,oo | o,oo | o,12 | o,oo | o,o8 | o,29 |
| g-Strophanthin | o,4o | o,49 | o,57 | o,64 | o,77 | o,95 |
| k-Strophanthin | o,29 | o,36 | o,42 | o,4o | o,51 | o,64 |
| Convallatoxin | o,18 | o,31 | o,42 | o,38 | o,44 | o,51 |
| Proscillaridin A | o,oo | o,oo | o,o6 | o,25 | o,41 | o,58 |
| Cortison | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| Prednisolon | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,13 | o,27 |
| Spironolacton | o,oo | o,oo | o,1o | o,oo | o,oo | o,o2 |
| Testosteron | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| Östriol | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |
| Progesteron | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo | o,oo |

Tab. I (Fortsetzung)

| Substanz | Vorgabe 1ooo,o Min. | Ø | Max. | Beurteilung der Kreuzreagibilität |
|---|---|---|---|---|
| Digoxin | 33,71 | 52,44 | 112,89 | |
| Digoxigenin | 27,81 | 33,71 | 42,46 | ++++ |
| -Acetyldigoxin | 52,44 | 68,22 | 97,o6 | +++ |
| ß-Methyldigoxin | 33,71 | 39,9o | 45,35 | ++++ |
| Dimethyldigoxin | 39,9o | 52,44 | 75,75 | ++++ |
| Dihydrodigoxin | 1,38 | 1,59 | 1,87 | (+) |
| Dihydro-ß-methyldigoxin | o,81 | o,98 | 1,o6 | (+) |
| Lanatosid C | 2o,35 | 24,51 | 33,71 | +++ |
| Gitoxin | 7,4o | 7,84 | 9,24 | +++ |
| 16-O-Acetylgitoxin | 5,51 | 6,o3 | 6,36 | + |
| Neriifolin | 6,48 | 7,12 | 7,84 | +++ |
| Pentaacetylgitoxin | 6,99 | 7,84 | 8,5o | ++ |
| Lanadoxin | 2,46 | 2,78 | 3,13 | + |
| Digitoxin | 7,69 | 8,33 | 9,64 | ++++ |
| Digitoxigenin | 5,92 | 6,36 | 7,12 | ++ |
| Thevetin | 7,84 | 8,33 | 8,86 | +++ |
| Dihydrodigitoxin | o,93 | 1,o4 | 1,26 | (+) |
| g-Strophanthin | 1,17 | 1,26 | 1,38 | + |
| k-Strophanthin | 2,33 | 2,55 | 2,83 | + |
| Convallatoxin | 3,47 | 3,84 | 4,25 | (+) |
| Proscillaridin A | 2,37 | 2,59 | 2,93 | (+) |
| Cortison | o,oo | o,oo | o,o2 | - |
| Prednisolon | o,1o | o,18 | o,26 | - |
| Spironolacton | o,24 | o,34 | o,44 | - |
| Testosteron | o,oo | o,oo | o,oo | - |
| Östriol | o,oo | o,o6 | o,16 | - |
| Progesteron | o,oo | o,oo | o,oo | - |

++++ ≙ Kreuzreaktion ab 1,o ng/ml Vorgabe der jeweiligen Substanz
+++ ≙ Kreuzreaktion ab 5,o ng/ml Vorgabe der jeweiligen Substanz
++ ≙ Kreuzreaktion ab 1o,o ng/ml Vorgabe der jeweiligen Substanz
+ ≙ Kreuzreaktion ab 1oo,o ng/ml Vorgabe der jeweiligen Substanz
(+) ≙ Kreuzreaktion ab 1ooo,o ng/ml Vorgabe der jeweiligen Substanz
- ≙ keine Kreuzreaktion

Tab. I (Fortsetzung)

| Vorgabe | 0,0 | | | 1,25 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Min. | ø | Max. | Min. | ø | Max. |
| Poolserum | 0,00 | 0,00 | 0,05 | - | - | - |
| Hämolytisches Serum | OR | OR | OR | OR | OR | OR |
| Ikterisches Serum | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,21 | 1,30 | 1,39 |
| Lipämisches Serum | OR | OR | OR | OR | OR | OR |
| Urämisches Serum | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,40 | 0,47 | 0,51 |

Alle Zahlenwerte tragen die Benennung ng/ml

OR ≙ over range
Min. ≙ geringste gefundene Konzentration
ø ≙ durchschnittlich gefundene Konzentration
Max. ≙ höchste gefundene Konzentration

Tab. II: Wiederfindung einer bestimmten Digoxinvorgabe in pathologischen Seren unter Verwendung des EMIT-Digoxin-Assay.

## 1o. Nachtrag

Da der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit Ende 1976 ausgeführt wurde und die Niederschrift Anfang 1977 erfolgte, möchte ich im Hinblick auf die schnelle Weiterentwicklung der enzymatischen Untersuchungsmethoden die aktuelle Situation kurz referieren.

Nach dem oben ausführlich dargestellten homogenen EMIT-Digoxin-Assay hat ein weiterer homogener Immunoassay, der also kein Abtrennungsverfahren erfordert, unter der Bezeichnung Spin-Immunoassay FRAT$^{R}$ (Free Radical Assay Technique) Eingang in die Routine gefunden.

### 1o.1. FRAT$^{R}$ Spin-Immunoassay (9)

Beim Spin-Immunoassay werden Nitroxid-Radikale zur Markierung von Haptenen verwendet. Diese haben ein einfaches Elektronenspinresonanz-Spektrum unter der Voraussetzung, daß sich die Moleküle in Lösung frei bewegen können. Wenn jedoch die Beweglichkeit der markierten Verbindung behindert ist, ergeben sich eine Verbreiterung der Spektrallinien und eine signifikante Verminderung der Signalintensität. Die Messung der Intensität der Signale ist daher ein Maß zur Ermittlung der Konzentration des freibeweglichen markierten Haptens.
Eine solche Verminderung der Beweglichkeit tritt ein, wenn das nitroxidmarkierte Hapten durch ein großes Molekül, zum Beispiel einen spezifischen Antikörper, der sich relativ langsam in Lösung bewegt, gebunden wird. Bei der Durchführung eines Spin-Immunoassays konkurriert das markierte Hapten mit dem zu bestimmenden Hapten um Antikörper-Bindungsstellen. Eine niedrige Haptenkonzentration in der Analysenprobe läßt viele Antikörper für die Bindung des markierten Haptens frei. Die Signalintensität des Elektronenspinresonanz-Spektrums ist vermindert. Umgekehrt bleiben bei hoher Haptenkonzentration in der Probe viele markierte Haptene frei in Lösung, wodurch die Signalintensität des Elektronenspinresonanz-Spektrums erhöht ist.

Auf dem Prinzip der homogenen Immunoassays beruht auch eine neue Methode, bei der Cofaktor-markierte Haptene die zentrale Stelle einnehmen.

1o.2. Cofaktor-markierte Haptene (4)

Hierbei wird NAD an ein Hapten kovalent gebunden. Im ersten Schritt wird Lactat in Gegenwart von Lactatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, und es entsteht das reduzierte Hapten-NADH. Im zweiten Schritt wird Hapten-NADH durch das Enzym Diaphorase in Gegenwart von oxidiertem Thiazolylblau wieder oxidiert. Das regenerierte Hapten-NAD tritt wieder in den Beginn des Reaktionskreislaufes ein und verursacht somit eine Anhäufung des reduzierten Thiazolblau, das als Indikator der Reaktion gemessen wird. Wenn ein spezifischer Antikörper gegen das Hapten der Lösung zugegeben wird, ist die Reaktion des Hapten-NAD-Konjugates gehemmt. Bei der Bestimmung eines freien Haptens in einer Analysenprobe konkurrieren dieses freie Hapten und das Hapten-NAD um die Antikörperbindungsstellen. Die Stärke der Hapten-NAD-Hemmung ist daher ein Maß für die Konzentration des zu bestimmenden Haptens in der Testprobe. Mittels dieser Methode wurden bisher die Haptene Biotin und 2,4-Dinitrophenol quantitativ bestimmt (4).

Die heterogenen Enzymimmunoassays, die in ihrer Methode ein physikalisches Abtrennungsverfahren des von einem Antikörper gebundenen Antigens von dem freien Antigen beinhalten, sind unter der Bezeichnung ELISA (Enzyme-linked Immuno-sorbent Assays) in die klinische Routine eingeführt worden.

1o.3. Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay (ELISA)(1,5,1o,12)

Der Test beruht auf dem Kompetitionsprinzip. Dabei wird im ersten Schritt das zu bestimmende Antigen mit einer festgelegten Menge des enzymkonjugierten Antigens inkubiert. Das konjugierte Antigen und das Antigen der Testprobe konkurrieren nun um die Bindungsstellen einer vorgegebenen geringen Menge eines unlöslichen spezifischen Antikörpers. Dieser Antikörper kann in einer kommerziellen Testvariante an der Innenwand der Teströhrchen fixiert sein. Nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes werden die in Lösung verbliebenen Antigene abgetrennt und die Enzymaktivität des Überstandes bzw. der festen Phase nach Substratzusatz und einem zweiten Inkubationsschritt bestimmt. Die Enzymaktivität der festen Phase ist umgekehrt proportional, die des Überstandes direkt proportional zur Antigenkonzentration in der Analysenprobe.

Die Nachweisgrenze der Methode liegt für Digoxin bei o,3 bis o,5 ng/ml und genügt damit den klinischen Ansprüchen. Im Testserum vorkommende Substanzen, die eine dem Digoxin ähnliche chemische Struktur besitzen, können allerdings relevante Störungen durch Kreuzreagibilität verursachen. Hinzu kommen unter Umständen biologisch inaktive Stoffwechselprodukte des Digoxins, die zum Teil ebenfalls noch um die Bindungsstellen konkurrieren (6). Störungen durch Hämolyse, Ikterus oder Hyperlipämie sind bisher nicht aufgefallen. Der heterogene Enzymimmunoassay dürfte in dieser Beziehung weniger anfällig sein als der homogene Enzymimmunoassay (7). Im Gegensatz zum homogenen Enzymimmunoassay, der weitgehend mechanisiert werden kann (11) und aus meßtechnischen Gründen auch sollte, ist der heterogene Enzymimmunoassay mit den zur Zeit bekannten Analysegeräten nicht voll mechanisierbar.

Wie bei den Radioimmunoassays wurde bei den heterogenen Enzymimmunoassays auch eine nicht-kompetitive Bindungsanalyse oder "Sandwich"-Technik entwickelt.

1o.4. Nicht-kompetitive Bindungsanalyse ("Sandwich"-Technik)

Dieser Test erfordert die Wechselwirkung folgender drei Moleküle:

1. eines an einen unlöslichen Träger gebundenen spezifischen Antikörpers gegen das zu bestimmende Antigen
2. des zu bestimmenden Antigens in der Analysenprobe und
3. eines enzymmarkierten Antikörpers gegen das zu bestimmende Antigen.

Im ersten Reaktionsschritt reagiert das Antigen der Analysenprobe mit dem Antikörper an der festen Phase. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wird die Probe entfernt und der enzymmarkierte Antikörper zugesetzt. Am Ende der Reaktionszeit wird die überstehende Lösung aspiriert und die verbleibende Enzymaktivität der festen Phase gemessen. Die Enzymaktivität ist der Antigenkonzentration in der Analysenprobe direkt proportional. Alternativ kann auch ein Antigen an die feste Phase gebunden werden und der korrespondierende Antikörper in der Testprobe bestimmt werden (2).

Es existiert noch eine Variante dieser Methode, bei der ein dritter Antikörper verwendet wird. Hierbei ist der dritte Anti-

körper mit einem Enzym markiert und reagiert mit dem nicht markierten zweiten Antikörper, der an Antigen gebunden ist ("Doppel-Sandwich"-Enzymimmunoassay). Auch bei diesem Testsystem läßt sich durch die Bestimmung des gebundenen Enzym-"labels" die Konzentration des Antigens direkt bestimmen (8).

Über die oben beschriebenen Testverfahren hinaus werden zur Zeit noch der Fluoreszenz-Immunoassay, der Phagenimmunoassay und biologische Membranelektroden diskutiert. Sie sind im Augenblick vornehmlich von akademischem Interesse.

1o.5. Fluoreszenz-Immunoassay

Im Fluoreszenz-Immunoassay ist ebenfalls entweder das Antigen oder der Antikörper mit einer fluoreszierenden Verbindung markiert. Die mikroskopische Untersuchung von Fluoreszenzmustern an Gewebeschnitten oder Zellen ist die klassische Methode des Immunfluoreszenztests. Modifikationen dieser Methode machen auch die Bestimmung von Antigenen und Antikörpern in Lösung möglich. Wie bei Radio- oder Enzymimmunoassays kann durch Anwendung der kompetitiven oder nicht-kompetitiven Testmethoden die freie oder an der festen Phase gebundene Fluoreszenz des Reagenzes mit Hilfe eines Fluorometers nachgewiesen werden.

1o.6. Phagenimmunoassays

Auch Phagen können als Indikatoren bei Immunoassays verwendet werden (7). Bei dieser Methode werden Haptene kovalent an Phagen gebunden. In einer kompetitiven Reaktion konkurrieren das freie Hapten der Testprobe und das phagengebundene Hapten um die haptenspezifischen Antikörper. Wenn die Reaktionsmischung nach einer bestimmten Inkubationszeit unter Anwesenheit von Escherichia coli kultiviert wird, lysiert das ungebundene Phagen-Hapten-Konjugat die Bakterien. Der Phagen-Hapten-Antikörperkomplex ist dagegen nicht infektös. Der Grad der Bakteriolyse in der Kultur ist daher direkt proportional der Konzentration des zu bestimmenden Haptens in der Testprobe.

1o.7. Biologische Membranelektroden

Die Technik, empfindliche und selektive Messungen in Gewebe und einzelnen Zellen von lebenden Organismen durchzuführen, hat ei-

nen Entwicklungsstand erreicht, bei dem dieses Ziel durch die Anwendung potentiometrischer Membranelektroden teilweise realisiert werden kann. Diese neue Richtung in der Bioelektrochemie basiert auf der Anwendung ionenselektiver Elektroden, die aus Glas-, Flüssig- oder Kristallmembranmaterial bestehen. Für biomedizinische Zwecke können diese Elektroden in der Kombination mit spezifischen biologischen Verbindungen, zum Beispiel Enzymen und Proteinen, für die Bestimmung von Komponenten in Körperflüssigkeiten Anwendung finden.

11. Literaturverzeichnis zum Nachtrag

1. BONACKER, L.H., HEVEY, R.C., in: Serum Protein Abnormalities (Ed.: S. Ritzmann, J. Daniels), S. 161, Boston 1975

2. BONACKER, L.H., HEVEY, R.C.: Nicht-isotopische Immunoassays. Laboratoriumsblätter 27, 5 (1977)

3. BORNER, K., RIETBROCK, N.: Bestimmung von Digoxin im Serum, Vergleich von Radioimmunoassay und heterogenem Enzymimmunoassay. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 335 (1978)

4. CARRICO, R.J., CHRISTNER, J.E., BOGULASKI, R.C., YEUNG, K. K.: Anal. Biochem. 72, 271 (1976)

5. ENGVALL, E., PERLMANN, P., in: Automation in Microbiology and Immunology (Ed.: C.-G- Heden, T. Illeni), S. 527, New York - London 1975

6. FLASCH, H., HEINZ, N., PETERSEN, R.: Arzneimittelforsch./ Drug Res. 27, 649 - 653 (1977)

7. HAIMOVICH, J., SELA, M.: J. Immunol. 97, 338 (1966)

8. KYREIN, H.J.: Der Enzym-Immunoassay (EIA), Ärztl. Lab. 24, 62, (1978)

9. LEUTE, R.K., ULLMANN, E.F., GOLDSTEIN, A., HERZENBERG, L.: Nature, New Biol. 236, 93 (1972)

10. SCHARPE, S.L., COOREMAN, W.M., BLOMME, W.J., LAEKEMAN, G.M.: Clin. Chem. 22(6), 733 (1976)

11. VOGT, W., TAUSCH, A., JACOB, K., KNEDEL, M.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 194 - 195 (1977)

12. WISDOM, G.B.: Clin. Chem. 22(8), 1263 (1976)

Herrn Professor Dr.Dr.E.H.Graul, Ordinarius und Direktor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin in Marburg, danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit.
Herrn Dozenten Dr. H.Müller danke ich für Gespräche und Anregungen bei der Durchführung der Untersuchungen.
Die Messungen erfolgten in den Behringwerken Marburg. Herrn Dr. B.Müller danke ich bestens für sein Engagement und seine Unterstützung.

Lebenslauf

Am 12. Juni 1949 wurde ich, Gernot Förster, als Sohn des Schlossers Hans Förster und seiner Ehefrau Lydia, geb. Nußkern, in Ludwigshafen/Rhein geboren.

Von 1956 bis 1961 war ich Schüler der Pestalozzi-Schule in Mutterstadt. Anschließend besuchte ich bis zum Abitur 1969 den humanistischen Zweig des Staatlichen Theodor-Heuss-Gymnasiums in Ludwigshafen/Rhein.
Von 1970 bis 1972 absolvierte ich in Ludwigshafen/Rhein eine Ausbildung als Apothekerassistent.
Im April 1973 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg das Medizinstudium und legte im März 1975 die Ärztliche Vorprüfung und im März 1976 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Ich nahm im Herbst 1976 die Arbeiten an meiner Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Marburg auf. Im März 1978 bestand ich den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und werde im April 1979 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegen.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Aziz, Bode, Braasch, Buchholz, Daume, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Eißner, Emmrich, Eschenbach, Exner, Friederich, Gerdes, Geus, Graul, Haberich, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heene, Hensel, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Huch A., Ihm, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Kleinsasser, Knauff, Koch, Koransky, Kuni, Lange, Lehmann, Mannheim, Maroske, Martini, Massarat, Meyer-Bertenrath, Müller H., Müller U., Neurath, Niemeyer, Oepen H., Oepen I., Perst, Petry, Pohlen, Popp, Pots, Priebe, Remschmidt, Richter, Riecken, Rodeck, Rohen, Rupec, Schaumlöffel, Schiff, Schmitz-Moormann, Schönhärl, Schüffel, Schulte-Hermann, Siegert, Siegrist, Slenczka, Sodomann, Solcher, Stäcker, Straub, Sturm, Stutte, Thoenes, Welge-Lüssen, Wendt, Willenbockel.